

**VIRULENTIE-FACTOREN BIJ GEINDUCEERDE MUTANTEN  
VAN STAPHYLOCOCCUS AUREUS**

**PROEFSCHRIFT**

ter verkrijging van de graad van doctor in de geneeskunde  
aan de Medische Faculteit te Rotterdam,  
op gezag van de dekaan Dr. J. Moll, hoogleraar in de  
faculteit der geneeskunde, tegen de bedenkingen van het college  
van dekanen uit de faculteit der geneeskunde te verdedigen  
op woensdag 27 september 1972 te 16.00 uur

door

JAN CAREL MARIA VAN DER VIJVER

geboren te Schiedam in 1937

Promotor : Prof. Dr. M. F. Michel

Co-referenten: Prof. Dr. H. A. Valkenburg

Prof. Dr. F. Wensinck

Dit onderzoek werd verricht op de afdeling Klinische Microbiologie en  
Antimicrobiële Therapie, hoofd: Prof. Dr. M. F. Michel

Aan mijn ouders

Druk: Reproductieafdeling

Medische Faculteit Rotterdam

## V O O R W O O R D

Het verrichten van dit voor een klinikus ongewoon onderzoek is voor de schrijver vormend en boeiend geweest.

Mijn promotor Prof. Dr. M.F. Michel ben ik in de eerste plaats erkentelijk vorm te hebben gegeven aan mijn vage plannen mijn werkterrein tijdelijk te verleggen en voor de keuze van het onderwerp. Zijn nooit aflatende belangstelling, stimulerende begeleiding en niet in het minst zijn gevoel voor de vrijheid van de onderzoeker zijn voor mij een belangrijke steun geweest. De vriendschappelijke relatie die met de familie Michel is ontstaan wordt zeer gewaardeerd. Vanaf de periode dat het onderzoek ernst begon te worden werd ik bijgestaan door Mary van Es-Boon. Haar enthousiasme bij het vele werk dat met kundigheid en fantasie werd verricht heeft zeer veel bijgedragen tot het tot stand komen van dit proefschrift. Het was prettig om dagelijks met haar samen te werken.

Prof. Dr. F. Wensinck ben ik erkentelijk voor het overwinnen van een zekere weerzin tegen zuurstof-verbruikende micro-organismen. Zijn terloopse adviezen tijdens onze dagelijkse gesprekken en nuttige kritiek op de uiteindelijke vormgeving hebben mij zeer geholpen.

Prof. Dr. H.A. Valkenburg was bereid de inhoud van dit proefschrift te beoordelen en mij van advies te dienen over de bewerking van de resultaten hetgeen op prijs werd gesteld.

Loes Samsom maakte het manuscript persklaar hetgeen met totale inzet en in een prettige samenwerking werd gedaan.

Dr. J.R.J. Bänffer dank ik voor zijn belangstelling en zijn adviezen.

Allen die op enigerlei wijze hebben medegewerkt aan het tot stand komen van dit proefschrift ben ik erkentelijk voor hun bijdrage.

In het bijzonder zou ik nog willen noemen Kees Kraayeveld die als student-assistent enkele experimenten verrichtte, Nora Douwes-Idema en Cora van Wijk-Lekkerkerker die mij tijdelijk als analisten behulpzaam waren.

De medewerkers van de polikliniek voor Inwendige Geneeskunde III en in het bijzonder zuster H.D. Walraven dank ik voor het begrip dat zij opbrachten voor mijn werkzaamheden elders.

## I N H O U D

DOEL VAN HET ONDERZOEK .....	1
HOOFDSTUK 1. FACTOREN DIE VERBAND HOUDEN MET PATHOGENITEIT EN VIRULENTIE VAN <u>S. AUREUS</u> .....	2
HOOFDSTUK 2. HET INDUCEREN VAN MUTANTEN BIJ STAPHYLOCOCCUS AUREUS .....	9
INLEIDING .....	9
MATERIAAL EN METHODEN .....	11
RESULTATEN .....	19
A. Een onderzoek naar de eigenschappen van 100 <u>S. aureus</u> stammen .....	19
B. Het selecteren van <u>S. aureus</u> stammen voor mutatieinductie.	21
C. Oriënterend onderzoek naar het mutatieinducerend vermogen van ethylmethaansulfonaat bij de stammen V2, V4 en V5.....	23
D. Mutatieinductie van stam V4 voor het verwerven van monomutanten .....	28
E. De groeisnelheid van stafylokokkenstammen .....	33
F. Productie van $\alpha$ - en $\delta$ -toxine door moederstam en verlies- mutanten .....	35
BESPREKING .....	40
HOOFDSTUK 3. LYSOGENE CONVERSIE NAAR PRODUCTIE VAN STAFYLOKINASE EN LEUCOCIDINE .....	42
INLEIDING .....	42
MATERIAAL EN METHODEN .....	44
RESULTATEN .....	48
A. Inleidend onderzoek naar verschillen in lysogenie van de moederstam V4 en de mutanten .....	48
B. Serologisch onderzoek van de geïnduceerde fagen van de moederstam .....	50
C. Het genezen van de moederstam V4 van zijn lysogene fagen..	54
D. Lysogene conversie van de stam V4 naar productie van stafylokinase en verandering in leucocidineproductie door twee serologisch verschillende profagen .....	62
BESPREKING EN CONCLUSIE .....	66

#### HOOFDSTUK 4. ONDERZOEK NAAR VERSCHILLEN IN VIRULENTIE TUSSEN

MOEDERSTAM EN MUTANTEN IN HET DIEREXPERIMENT .....	68
INLEIDING .....	68
MATERIAAL EN METHODEN .....	70
RESULTATEN .....	72
A. Onderzoek naar virulentieverschillen tussen moederstam en mutanten na subcutane injectie bij de muis .....	72
B. Onderzoek naar virulentieverschillen tussen moederstam en mutanten na intraveneuze injectie bij de muis en het konijn .....	77
C. Het effect van subcutane injectie van <u>S. aureus</u> en <u>S. epidermidis</u> bij muizen die een totale lichaamsbestraling met röntgenstralen hebben ondergaan .....	87
BESPREKING EN CONCLUSIE .....	92

#### HOOFDSTUK 5. DE BETEKENIS VAN HET IN DE CELWAND VAN VIRULENTE

<u>S. AUREUS</u> STAMMEN GELOCALISEERDE AGRESSINE .....	95
INLEIDING .....	95
MATERIAAL EN METHODEN .....	95
RESULTATEN .....	96
A. Onderzoek naar agressineactiviteit van D.O.C.R. van stam V4 .....	95
B. Virulentieversterking van stam Wood 46 door D.O.C.R. van stam PS80 .....	98
C. Het lesieversterkend effect van D.O.C.R. van stam PS80 bij de mens .....	100
BESPREKING EN CONCLUSIE .....	101
SAMENVATTING .....	103
SUMMARY .....	107
LITERATUUR .....	111

## DOEL VAN HET ONDERZOEK

Staphylococcus aureus maakt een groot aantal producten die in verband kunnen staan met de pathogeniteit of virulentieverschillen tussen stammen zouden kunnen verklaren. Van de meeste van deze producten is echter niet met zekerheid aangetoond dat ze een bijdrage leveren tot de pathogeniteit noch in welke mate zij dit doen. Men neemt aan dat de pathogeniteit van S. aureus wordt veroorzaakt door een samenspel van factoren en dat niet één factor bepalend is.

In dit onderzoek is geprobeerd een virulente S. aureus stam door behandeling met een mutagene stof telkens één eigenschap te laten verliezen om vervolgens na te gaan in hoeverre een dergelijk verlies de virulentie, bepaald in het dierexperiment, beïnvloedt.

Omdat veranderingen van eigenschappen kunnen worden veroorzaakt door lysogenisatie met een gematigde faag of genezing van een reeds aanwezige profaag, is nagegaan of de verkregen verliesmutaties veroorzaakt worden door aan- of afwezigheid van profaag.



## Hoofdstuk 1

### FACTOREN DIE VERBAND HOUDEN MET PATHOGENITEIT EN VIRULENTIE VAN STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Pathogeniteit kan men omschrijven als een kenmerkende eigenschap van een soort van micro-organisme om bij een bepaalde diersoort een ziekte te kunnen verwekken. Virulentie is de graad van ziekmakend vermogen van een stam van een pathogene soort. Virulentie heeft dus betrekking op verschillen in ziekmakend vermogen binnen de soort.

Staphylococcus aureus is een voor mens en een aantal diersoorten pathogeen micro-organisme. Hij komt als commensaal voor in de neus en op de huid in 20-40% van een normale mensenpopulatie (Williams, 1967). Kolonisatie is dus regel, terwijl infectie relatief zeldzaam is. Bij de mens is hij de verwekker van meestal kleine huid- en slijmvliesinfecties, die onder bepaalde voorwaarden de neiging hebben zich lokaal of algemeen uit te breiden.

De vraag of hierbij virulentieverschillen tussen verschillende S. aureus stammen betekenis hebben, is tot nu toe niet beantwoord.

Gastheerfactoren zijn voor het ontstaan van een infectie met S. aureus van groot belang. Hiervoor zijn zowel uit de pathologie bij de mens als uit experimenteel onderzoek voldoende argumenten aan te voeren. Ongeveer tweederde van de in het ziekenhuis verworven infecties blijken chirurgische wondinfecties te zijn (Minchew en Cluff, 1961). Ernstige huidinfecties door S. aureus worden frequent gezien bij 3e graads verbrandingen of andere necrotische huidlesies (Keene, Minchew en Cluff, 1961). Patientten met een stafylokokkenbacteriëmie blijken in een hoog percentage reeds een andere ziekte te hebben die de algemene weerstand verzwakt (Cluff en medewerkers, 1968). Ook bij experimenteel onderzoek blijkt de rol van de gastheer. De minimale pusvormende dosis voor de huid is bij de mens 2 tot  $8 \cdot 10^6$  bacteriën. Dit aantal kan met een factor  $10^4$  omlaag worden gebracht, wanneer een hechtdraad als vehiculum wordt gebruikt (Elek, 1957). Bij de muis kan de minimale pusvormende dosis van  $10^6$  bacteriën tot  $10^2$  worden teruggebracht,

wanneer het inoculum in katoenstof wordt ingespoten (Noble, 1965). Het is aangetoond dat katoenstof de ontstekingsreactie remt (Agarwal, 1967a). De gebruikelijke cellulaire reactie op de aanwezigheid van stafylokokken in weefsel is een infiltratie van granulocyten op de plaats van het inoculum. In het spel van bacterie en afweerkrachten van de gastheer is de granulocyt waarschijnlijk van overheersende betekenis. Andere factoren zoals de immunologische reactiviteit van de gastheer op de bacterie of bacterieproducten lijken althans in het dierexperiment eveneens van belang te zijn (Cluff, 1965). Op grond van deze en andere gegevens lijkt het waarschijnlijk dat factoren die de locale of algemene weerstand verzwaken bepalen of een besmetting met S. aureus aanleiding geeft tot een infectie.

Een micro-organisme dat in staat is een infectieziekte te verwekken moet zich aan de porte d'entrée kunnen handhaven tegen de afweerkrachten van de gastheer. Het zijn vooral de eerste uren van de besmetting die in dit opzicht doorslaggevend zijn (Miles, Miles en Burke, 1957). Pathogene micro-organismen moeten dus uitgerust zijn met een speciaal biochemisch arsenaal, waardoor zij zich in de gastheer kunnen vermeerderen. De factoren die bepalend zijn voor de pathogeniteit en virulentie van een bacteriesoort zijn reeds meer dan een halve eeuw onderwerp van experimenteel onderzoek. Dit onderzoek is in eerste instantie gericht op de identificatie van deze factoren en hun relatief belang. Er bestaat een zeker contrast tussen het succes in de bestrijding van een groot aantal infectieziekten en het geheel van kennis omtrent de factoren die een bacteriesoort pathogeen maken, de chemische analyse van deze factoren en hun biologische activiteit. Dit geldt in hoge mate voor S. aureus. Het is waarschijnlijk dat bij de meeste micro-organismen niet één substantie bepalend is voor de pathogeniteit.

Voor het veroorzaken van een infectie moet de bacterie zich in de gastheer kunnen vermeerderen. Hij zal dus gebruik moeten maken van de nutriënten die hem geboden worden. Nu lijkt het niet waarschijnlijk dat voedingsomstandigheden de pathogeniteit in belangrijke mate bepalen, aangezien het dierlijk weefsel meestal wel voldoende nutriënten bevat. Wel zal dit van betekenis kunnen zijn voor de keuze van het weefsel. In dit opzicht lijkt het verantwoord de kolonisatie van de huid door stafylokokken in verband te brengen met de productie van lipasen en esterasen, waarmee ze de lipiden van de huid als voedselbron kunnen gebruiken (Stewart, 1965).

Naast het vermogen gebruik te maken van de nutriënten die in de gastheer aanwezig zijn, zijn waarschijnlijk stoffen die direct gericht zijn tegen de natuur-

lijke afweer van de gastheer van primair belang. Deze stoffen worden agressinen genoemd. Ze zijn niet noodzakelijkerwijs toxisch in de zin van de klassieke toxinen, die het ziektebeeld en eventueel de dood van de gastheer veroorzaken. Smith (1968) onderscheidt verschillende agressinen, die voor een deel ook bij een aantal pathogene soorten zijn aangetoond, zoals remmers van bloed- en weefselbactericidinen, stoffen die interfereren met de migratie van fagocyten en met het fagocytoseproces zelf en remmers van de in fagocyten aanwezige bactericidinen. Het lijkt waarschijnlijk dat S. aureus met een aantal van deze agressinen is uitgerust. Adlam, Pearce en Smith (1968) toonden bijvoorbeeld aan dat S. aureus die een aantal konijnen-passages had doorgemaakt virulenter voor het konijn was geworden en tegelijk ook een grotere resistentie had ontwikkeld tegen de bactericide werking van konijne-serum en extracten van konijne-granulocyten dan de in vitro groeiende stam. S. aureus produceert bovendien leucotoxische stoffen, die leucocidinen worden genoemd. Fisher (1963, 1965) en Hill (1968, 1969) beschreven een bestandeel van de celwand met agressinewerking. Tenslotte is bekend dat S. aureus intracellulair kan blijven leven na fagocytose door konijne- en mense-granulocyten (Rogers, 1956; Worms, 1966). Van de meeste stafylokokken-producten is echter niet of onvoldoende bekend wat hun bijdrage is tot de pathogeniteit. Een aantal producten waarvan wordt verondersteld dat ze in verband staan met de pathogeniteit van S. aureus zullen thans worden besproken.

#### 1. DE CELWAND.

In de celwand van virulente S. aureus stammen bevindt zich één of meerdere factoren die multiplicering van de bacterie en vorming van een lesie bevorderen (Fisher, 1963, 1965; Hill, 1968). De minimale pusvormende dosis bij de muis is bij subcutane injectie van een muisvirulente stam ongeveer  $10^6$  bacteriën (Fisher en Robson, 1963). Wanneer dode cellen of celwanden van de experimentele stam 1531 aan een lagere dosis bacteriën worden toegevoegd treedt er eveneens een lesie op. Fisher (1965) extraheerde het infectiebevorderende bestandeel uit de celwanden. Bij coagulase-negatieve stafylokokken kon het "Fisher agressine" niet worden aangetoond. Agarwal (1967a en b) toonde aan dat muisvirulente stammen, wanneer ze met katoenstof subcutaan worden ingespoten, met lagere doses bacteriën grotere lesies geven dan niet muisvirulente stammen. Deze stammen bezitten een factor die oedeemvorming en leucocytenmigratie tegengaat. Hill (1968) kon deze factor uit de celwand isoleren en waarschijnlijk maken dat zij een mucopeptide-eiwitcomplex is. Stammen die niet muisvirulent zijn bezitten deze factor

niet. Muizen die met dit preparaat actief of met antisera daartegen werden geimmuniseerd, waren beschermd tegen subcutane infectie van virulente S. aureus (Hill, 1969). Bij de mens worden waarschijnlijk onvoldoende antilichamen tegen dit agressieve gemaakt, aangezien serum van patienten met een chronische stafylokokkeninfectie geen bescherming gaf. De agressieven van Fisher en Hill zijn mogelijk identieke factoren, die verband lijken te houden met de pathogeniteit van S. aureus.

## 2. DE HEMOLYSERENDE TOXINEN.

S. aureus produceert  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - en  $\delta$ -lysine. Het bestaan van  $\gamma$ -lysine (Smith en Price, 1938), dat in antigeniteit zou verschillen van  $\alpha$ -toxine, is gedurende lange tijd controversieel geweest maar onlangs bevestigd door Guonet en Plommet (1970). Over de betekenis van deze stof voor de pathogeniteit van S. aureus is niets bekend. Over  $\alpha$ -,  $\beta$ - en  $\delta$ -toxine bestaat een omvangrijke literatuur. Recent overzichten van de huidige kennis zijn gegeven door Arbuthnott (1970) en Wiseman (1970).

$\alpha$ -Toxine is een eiwit met letale en dermonecrotische activiteit bij alle tot dusver onderzochte diersoorten. Het is hemolytisch voor konijne-erythrocyten en in mindere mate voor erythrocyten van andere diersoorten. Mense-erythrocyten zijn relatief resistent. Het toxine heeft een direct toxische werking op gladde en dwarsgestreepte spieren en veroorzaakt paralyse. Bovendien brengt het schade toe aan een groot aantal andere weefselcellen van verschillende diersoorten, zoals de granulocyten van het konijn en de monoccyten van de mens. Deze in vitro aangetoonde cytopathogene effecten worden in verband gebracht met de activiteit op de celmembranen, waarin structurele veranderingen ontstaan met verlies van de normale permeabiliteit. Productie in vivo is ondermeer aangetoond door Gladstone en Glencross (1960) en Kapral (1965). Passieve en actieve immunisatie tegen  $\alpha$ -toxine hebben bij de mens niet geleid tot bescherming tegen infecties met S. aureus. Alleen in het dierexperiment werd een gedeeltelijke bescherming aangetoond namelijk verkleining van de huidlesie bij subcutane infecties en verlenging van de overlevingstijd na intraperitoneale besmetting (Kapral, 1963, 1965). Het exotoxine heeft dus niet dezelfde betekenis als de toxinen bij monotoxische ziekten als difterie en tetanus.

$\alpha$ -Toxine lijkt wel bij te dragen tot de pathogeniteit van S. aureus. Het is echter niet bekend in welke mate dit het geval is. Bij gelocaliseerde infecties levert  $\alpha$ -toxine door zijn dermonecrotische effect een bijdrage aan de weefsel-

beschadiging. Dit blijkt uit de experimenten van Taubler, Kapral en Mudd (1963), die  $\alpha$ -toxine verliesmutanten vergeleken met de moederstam. In tegenstelling tot de moederstam veroorzaakten deze mutanten geen of slechts geringe lesies wanneer hechtdraadjes besmet met deze stammen in de huid van muizen werden aangebracht. Belangrijker lijkt echter of  $\alpha$ -toxine een agressieve werking heeft, maar dit is naar de mening van de schrijver niet bekend. Bij gegeneraliseerde infecties lijkt  $\alpha$ -toxine bij te dragen tot de dood van de gastheer (Kapral, 1965). De symptomen die bij dodelijke vormen van stafylokokkensepsis optreden worden wel toegeschreven aan  $\alpha$ -toxine.

S. aureus, geïsoleerd bij de mens produceert soms  $\beta$ -toxine. Dit toxine wordt bij stammen van dierlijke oorsprong veel frequenter aangetroffen. Het is een "hot-cold" hemolyse voor schape-erythrocyten d.w.z. dat na incubatie bij 37°C de hemolyse wordt versterkt door afkoeling tot 4°C. De stof is, vergeleken met  $\alpha$ -toxine, weinig toxisch. Over de werking in vivo is niets bekend.

$\delta$ -Toxine heeft een breed hemolytisch spectrum. De erythrocyten van vrijwel alle diersoorten zijn gevoelig. Het toxine is van  $\alpha$ -toxine te onderscheiden door grote activiteit ten opzichte van paarde- en mense-erythrocyten (Marks en Vaughan, 1950). Het is cytotoxisch voor een groot aantal dierlijke cellen in weefselcultures, zoals granulocyten, macrofagen en lymfocyten van de mens. Het toxine wordt in een hoog percentage eveneens door coagulase-negatieve stafylokokken geproduceerd (Kleck en Donahue, 1968). Het is niet bekend of  $\delta$ -toxine een bijdrage levert aan de pathogeniteit van S. aureus.

### 3. PANTON-VALENTINE (P-V) LEUCOCIDINE.

P-V leucocidine is een extracellulair product dat toxisch is voor granulocyten en macrofagen van mens en konijn. Een recent overzicht van dit toxine is gegeven door Woodin (1970). Het bestaat uit twee eiwitten, de F (fast) en S (slow) component, die beide noodzakelijk zijn voor de toxische werking. Het toxine wordt in vivo geproduceerd (Gladstone en Glencross, 1960). Beide componenten zijn antigeen. Bänffer (1962) vond een negatieve correlatie tussen de hoogte van de anti-leucocidinetiter en het optreden van een mastitis puerperalis. Immunisatie met P-V leucocidine heeft echter een beschermende werking van anti-leucocidine niet kunnen aantonen (Bänffer en Franken, 1963; Mudd, Gladstone en Lenhart, 1965). Van het P-V leucocidine staat niet vast of het een factor is die bijdraagt tot de pathogeniteit van S. aureus.

#### 4. COAGULASE:-

Er bestaan twee vormen van coagulase. Het gebonden coagulase (clumping factor) bevindt zich aan de oppervlakte van de cel. Het is in staat fibrinogeen te adsorberen. Bij aanwezigheid van fibrinogeen ontstaat er samenklontering van de cellen. Er is geen enkele aanwijzing dat er verband zou bestaan tussen deze factor en het vrije coagulase (Tager en Drummond, 1965). Samenklontering van cellen zou in vivo bescherming kunnen geven tegen fagocytose, zoals door Kapral (1965) bij intraperitoneale besmetting van de muis aannemelijk werd gemaakt. Het is niet bekend of deze factor bij natuurlijke infecties enige betekenis heeft voor de pathogeniteit van S. aureus.

S. aureus vormt altijd vrij coagulase. Een coagulase-positieve stafylokok wordt daarom als een S. aureus beschouwd.

Bloed en plasma stolt onder invloed van vrij coagulase. Dit coagulase reageert met een plasmafactor (C.R.F.=coagulase-reacting-factor), die identiek bleek te zijn met prothrombine (Tager, 1956; Soulier, 1967). Er ontstaat een coagulase-CRF-complex dat thrombineactiviteit heeft, maar verschilt van het natuurlijke thrombine (Soulier, 1967). Coagulase is antigeen en immunisatie met partiëel gezuiverde coagulase-preparaten geeft enige bescherming tegen stafylokokkeninfecties bij konijnen (Boak, 1956; Lominski en medewerkers, 1962). Er zijn aanwijzingen dat de coagulasen die gevormd worden door stammen van de drie hoofdgroepen van het faagtyperingssysteem antigeen verschillend zijn (Barber en Wildy, 1958).

Hoge doses coagulase geven defibrinatie bij het konijn (Tager, 1966). Ofschoon wordt aangenomen dat vrij coagulase een pathogene factor is, is het strikte bewijs hiervan niet geleverd.

#### 5. STAFYLOKINASE (FIBRINOLYSINE)

De meeste coagulase-positieve stafylokokken produceren stafylokinase dat plasminogeen activeert tot plasmine. Er bestaat geen zekerheid over de betekenis van dit enzym in de pathogenese van stafylokokkeninfecties (Elek, 1959).

#### 6. OVERIGE STAFYLOKOKKENENZYMEN EN -TOXINEN

S. aureus produceert nog een aantal enzymen zoals protease, lipase, fosfatase, DNase en hyaluronidase. Directe gegevens over hun eventuele betekenis voor de pathogeniteit van S. aureus ontbreken. Wel lijkt er een negatieve correlatie te bestaan tussen de virulentie van ziekenhuisstammen en het vermogen lipase te

produceren (Noble, 1966; Jessen e.a., 1969).

S. aureus kan enterotoxinen produceren. Een recent overzicht van deze toxinen is gegeven door Bergdoll (1970). Enterotoxinen spelen een rol bij voedselvergiftiging en stafylokokkenenterocolitis.

Bij pasgeborenen kan een oppervlakkige huidinfectie met coagulase-positieve stafylokokken, die tot faaggroep II behoren, aanleiding geven tot toxische epidermale necrolysis (ziekte van Leyell). Onlangs werd door Arbuthnott en medewerkers (1972) een van  $\alpha$ - en  $\delta$ -toxine verschillend "epidermolytisch toxine" aangetoond.

Het is waarschijnlijk dat de pathogeniteit van S. aureus door een samenspel van factoren wordt bepaald. De relatieve bijdrage van deze factoren zou kunnen verschillen al naar gelang het type infectie. Bovendien is er nog een aspect van de virulentie van pathogene bacteriesoorten, namelijk de mogelijkheid tot verspreiding van de ene gastheer naar de andere, die bij de gebruikelijke dierproeven niet kan worden onderzocht. Dit laatste zou wel eens de oorzaak kunnen zijn dat voor de meeste stafylokokkeninfecties het bewijs niet is geleverd dat er virulentieverschillen tussen S. aureus stammen bestaan. Uit epidemiologisch onderzoek van kruisinfecties in het ziekenhuis (Noble, 1966) bleek ondermeer dat epidemische stammen bij muizen grotere huidlesies veroorzaken dan niet-epidemische stammen. Muisvirulentie en de mogelijkheid tot spreiding waren beide gecorreleerd aan de productie van  $\alpha$ - en  $\beta$ -toxine.

## Hoofstuk 2

### HET INDUCEREN VAN MUTANTEN BIJ STAPHYLOCOCCUS AUREUS

#### I N L E I D I N G

Het induceren van mutaties bij virulente Staphylococcus aureus stammen werd ondernomen om stabiele verliesmutanten te verkrijgen, die in het dierexperiment met elkaar vergeleken konden worden. Op deze wijze zou het misschien mogelijk zijn om de bijdrage van een aantal eigenschappen tot de virulentie van S. aureus te bepalen. Het lag voor de hand naar verliesmutanten te zoeken die slechts één eigenschap hadden verloren, bijvoorbeeld het vermogen tot productie van een exotoxine. Deze mutanten worden in het vervolg monomutanten genoemd.

In vergelijking met Gram-negatieve bacteriën, zijn er bij stafylokokken weinig mutatieinductie-experimenten gedaan. Kapral en Li (1960) en Kapral (1965) induceerden met U.V.-licht monomutanten voor verlies van  $\alpha$ -toxine, het vrije en het gebonden coagulase. MacClatchy en Rosenblum (1966<sup>a</sup>) induceerden met U.V.-licht en salpeterigzuur. Zij verkregen verliesmutanten voor  $\alpha$ -toxine en mutanten voor een gecombineerd verlies van  $\alpha$ -toxine en stafylokinase. Het merendeel van deze mutanten waren in het geheel niet meer in staat tot productie van  $\alpha$ -toxine. Dit werd aannemelijk gemaakt door aan te tonen dat in de cultuurfiltraten van deze stammen zowel het vermogen om konijne-erythrocyten te lyseren als de letale en dermonecrotische activiteit ontbrak. Bij agar-gel diffusie van een anti- $\alpha$ -toxine-serum en cultuurfiltraten van deze stammen volgens de methode van Ouchterlony, werden precipitatielijnen niet waargenomen. De cultuurfiltraten van een andere groep mutanten, die nog wel een geringe lytische activiteit voor konijne-erythrocyten toonde, vormden wel precipitatielijnen. Bij laatstgenoemde stammen werd een met de moederstam vergelijkbare dermonecrotische en letale activiteit aangetoond. Er werd verondersteld dat



deze stammen een veranderd eiwit synthetiseerden. Tenslotte werd met transductieanalyse waarschijnlijk gemaakt dat bij de synthese van  $\alpha$ -toxine tenminste twee genetische loci betrokken zijn (MacClatchy en Rosenblum, 1966<sup>b</sup>). Eén van beide lijkt een pleiotroop gen, dat ook van wezenlijke betekenis is voor de productie van stafylokinase.

Bij het induceren van mutaties kunnen er varianten worden waargenomen die meer dan één kenmerk hebben verloren. Dit kan dan een uiting zijn van een mutatie in meer dan één gen, een deletie of een mutatie in een gen met multi-pele expressie (pleiotropie). Zo kon bijvoorbeeld voor een S. aureus mutant die een groot aantal suikers niet meer fermenteerde, het pleiotrope karakter van de mutatie in één gen worden vastgesteld door middel van reversie- en transductie-experimenten (Egan en Morse, 1965). Dit gen is noodzakelijk voor het transport van de suikers. Korman (1965) beschreef een aantal coagulase-negatieve mutanten van een S. aureus, die bovendien bacteriofaag-resistent waren geworden en mannitol niet meer fermenteerden. Het pleiotrope karakter van een mutatie in één gen, waarvan zij veronderstelde dat het de structuur van de celwand beïnvloedde, kon waarschijnlijk worden gemaakt. Wolin en medewerkers (1966) toonden bij deze stammen aan dat ribitol-teichinezuur in de celwand is vervangen door het bij Staphylococcus epidermidis voorkomende glycerol-teichinezuur.

Mutaties kunnen worden geïnduceerd door bestraling met ioniserende stralen en U.V.-licht of door een cultuur bloot te stellen aan mutagene stoffen. Loveless en Howarth (1959) induceerden mutaties bij Gram-negatieve bacteriën met ethylmethaansulfonaat. Ethylmethaansulfonaat (EMS) en ethylethaansulfonaat (EES) zijn evenals de stikstofmosterdverbindingen alkylerende stoffen. Ze zijn echter minder toxisch zodat het overlevingspercentage van de bacteriën na inductie relatief hoog is (Loveless en Howarth, 1959).

Het mechanisme van de mutatie-genese door alkylerende stoffen is vooral door het werk van Freese en medewerkers opgehelderd. Een overzicht hiervan wordt gegeven door Hayes (1968). Methylering door stikstofmosterdgas en ethylering door EES vindt plaats op plaats 7 van het guanine (Brookes en Lawley, 1960; Bautz en Freese, 1960). De binding

van het guanine met het deoxyribose wordt daardoor minder stabiel waardoor het guanine los kan raken van de DNA-streng. Bij daarop volgende replicatie van het DNA kan tegenover deze lege plaats in de plaats van het cytosine elk van de vier purine en pyrimidine-basen worden ingebouwd. Op deze manier kan het oorspronkelijke base-paar G-C (guanine-cytosine) vervangen worden door A-T (adenine-thymine), T-A of C-G. EMS en EES kan dus op theoretische gronden twee transversies en één "transition" doen ontstaan. Een transversie is een substitutie van een purine-base door een pyrimidine of van een pyrimidine-base door een purine. Onder een "transition" wordt een vervanging van een purine of pyrimidine door een gelijksoortige base verstaan. Deze theoretische mogelijkheden zijn door Freese en medewerkers experimenteel bevestigd, waarbij zij gebruik maakten van het R<sub>III</sub>-systeem van bacteriofaag T4. Transitions geven, in vergelijking met transversies, vaak aanleiding tot minder ingrijpende mutaties, waarbij de productie van een bepaald eiwit slechts is verminderd of alleen de functie van het eiwit is veranderd ("leaky mutants").

In dit hoofdstuk zullen de resultaten van mutatieinductie-experimenten worden medegedeeld. Als mutagene stof werd het EMS gebruikt. De methoden en technieken voor het testen van eigenschappen van S. aureus worden eerst beschreven. De bruikbaarheid van enkele plaat-methoden, die gebruikt zullen worden voor het zoeken naar verliesmutanten, zal worden onderzocht door 100 S. aureus stammen op een aantal eigenschappen te onderzoeken. Vervolgens zullen de verkregen mutanten worden onderzocht op hun geschiktheid voor een vergelijkend onderzoek in het dierexperiment.

## M A T E R I A A L   E N   M E T H O D E N

STAMMEN. Stafylokokkenstammen die uit klinisch materiaal waren geïsoleerd werden in gevriesdroogde vorm bewaard. Zij zullen in de resultaten worden besproken. De stam Wood 46 met een hoge  $\alpha$ -toxine productie en stam V8 van Gladstone en van Heyningen (1957), die een hoge productie van

P-V leucocidine heeft, werden verkregen van Dr. Bänffer (Bacteriologisch Laboratorium der Gemeenteziekenhuizen, Rotterdam).

VOEDINGSMEDIA. Specifieke media worden afzonderlijk beschreven. De algemeen gebruikte vaste voedingsbodem bestond uit Blood Agar Base (Oxoid) met 5% gedefibrineerd vers schapebloed. Vleesbouillon uit eigen keuken met 1% Bacto Peptone (Difco) en 0,5% NaCl werd gebruikt als vloeibaar medium.

RESISTENTIEBEPALING. Enkele kolonies van de te onderzoeken stam werden in ongeveer 5 ml fysiologisch zout gesuspenseerd. Een wattenstok werd met de suspensie bevochtigd en vervolgens aan de wand van de buis afgestreken. D.S.T. Agar (Oxoid) werd gelijkmatig beënt zodat een net niet confluerende laag van losliggende kolonies werd verkregen. Een Multodisk (Oxoid, codenummer 1523) en een 5 µg novobiocine bevattende schijfje (Difco) werden op de beënte agar geplaatst. Na 18 uur broeden bij 37°C werd het resistentiespectrum bepaald volgens standaardcriteria.

GEBONDEN COAGULASE. Voor het aantonen van gebonden coagulase werd op een dekglasje een dikke suspensie van stafylokokken gemaakt in een druppel fysiologisch zout, waarbij werd uitgegaan van een verse 18 uren cultuur op bloedagar. Tijdens het suspenderen werd gelet op autoagglutinatie. Indien dit niet waarneembaar was, werd een entoog vers menseplasma met de suspensie gemengd. Een binnen 5 seconden optredende klontering werd als positief beschouwd.

VRIJ COAGULASE. Twee druppels van een 18 uren cultuur in bouillon werden toegevoegd aan 0,5 ml konijneplasma (Difco). De resultaten van de buisjertest werden na 2 en 6 uur bij 37°C afgelezen en vervolgens na 18 uur bij kamertemperatuur. Elke vorm van stolling werd als positief beschouwd. Bij mutatieinductie-experimenten werd voor de selectie van coagulase-verliesmutanten aanvankelijk een vaste voedingsbodem volgens Klemperer en Haughton (1957) gebruikt. Dit medium bestaat uit een nutrient agar, waaraan fibrinogeen en humaan plasma is toegevoegd. Rond coagulase-positieve kolonies ontstaat er een opalescente halo. Aangezien er aan deze voedingsbodem bezwaren verbonden waren werd zij in een later stadium vervangen door een voedingsbodem die zelf werd ontwikkeld. Deze nieuwe voedingsbodem lijkt ook goed bruikbaar voor het onderscheiden van coagu-

lase-positieve en coagulase-negatieve stafylokokken in het routine bacteriologisch laboratorium (zie hiervoor het aan dit proefschrift toegevoegde appendix).

HEMOLYSE OP BLOEDAGAR (METHODE VOLGENS ELEK). De aanwezigheid van de hemolyserende toxinen  $\alpha$ -,  $\beta$ - en  $\delta$ -toxine werd onderzocht door stammen te laten groeien op Nutrient Agar (Oxoid), waaraan driemaal gewassen konijne-, schape- of mense-erythrocyten waren toegevoegd in een concentratie van 5%. Het hemolysinepatroon werd bepaald door stammen loodrecht te enten op een in anti- $\alpha$ -toxineserum (Burroughs en Wellcome, 150 I.U./ml) gedrenkt filtreerpapiertje. De platen werden 24 uur bij 37°C bebroed in potten die lucht met 15% CO<sub>2</sub> bevatten. Schape-erythrocyten bevattende agarplaten werden in duplo beënt. Eén van beide platen werd anaeroob bebroed gedurende 48 uur bij 37°C. Productie van  $\alpha$ -,  $\beta$ - en  $\delta$ -toxine werd afgelezen volgens de criteria van Elek en Levy (1950).

Bij mutatieinductie-experimenten werden voor selectie van verliesmutanten voor  $\alpha$ - en  $\delta$ -toxineproductie dezelfde agarplaten gebruikt met respectievelijk konijne- of mense-erythrocyten.

STAFYLOKINASE, Stafylokinaseactiviteit werd aangetoond op een fibrine bevattende vaste voedingsbodem (Lack en Wailing, 1954). De ingrediënten bestonden uit Nutrient Agar (Oxoid) en 12% humaan plasma afkomstig van afgekeurd transfusiebloed. Stafylokinase-positieve stammen vormen na uiterlijk 48 uur bebroeden bij 37°C een heldere hof rond de bacteriegroei.

DEOXYRIBONUCLEASE (DNase). DNase-activiteit werd getest op een DNase Agar (Oxoid), die deoxyribonucleïnezuur (DNA) bevatte. Na 18 uur bebroeden bij 37°C werden de platen met 1N azijnzuur overgoten. Intact DNA wordt door azijnzuur geprecipiteerd waardoor een troebeling ontstaat. Wanneer DNA door bacterie-nuclease wordt gehydrolyseerd, blijft er rondom de bacteriegroei een heldere zone bestaan. Aangezien bacteriën door azijnzuur worden gedood, werden de kolonies bij het selecteren van verliesmutanten van tevoren gerepliceerd met behulp van fluweel, dat over een rond blokje was gespannen.

TWEEN 20- EN TWEEN 80-SPLITSEND LIPASE. Het vermogen om tween 20 en tween 80 te splitsen werd onderzocht op een vaste voedingsbodem die tween 20, tween 80 en calcium bevatte (Sierra, 1957). Rond positieve stammen

worden na uiterlijk 4 dagen bebroeden bij 37°C kleine kristallen van calciumzepen gevormd, die als een opalescentie zichtbaar zijn.

**FOSFATASE.** Een vaste voedingsbodem bestaande uit Blood Agar Base (Oxoid) met 0,01% fenolftaleïnefosfaat (Oxoid) werd gebruikt voor het aantonen van fosfataseproductie (Barber en Kuper, 1951). Fosfatase-vormende kolonies worden rood als ze worden blootgesteld aan ammoniakdamp.

**HYALURONIDASE.** Hyaluronidaseproductie werd getest op een vaste voedingsbodem, die bovendien albumine fractie V (Sigma) en het natriumzout van hyaluronzuur (Sigma) bevatte (Smith en Willet, 1968). De methode berust op een precipitatiereactie van albumine en hyaluronzuur door azijnzuur. Door hyaluronidase gedepolimeriseerd hyaluronzuur precipiteert niet, waardoor rond de groei van een stam die hyaluronidase vormt een opheldering ontstaat wanneer de plaat met azijnzuur wordt overgoten.

**ONDERZOEK VAN ENKELE STOFWISSELINGSKENMERKEN.** Een aantal kenmerken die door Baird-Parker (1963) werden gebruikt voor de klassificatie van stafylokokken, werden onderzocht bij de moederstam en de mutanten. Deze kenmerken waren: zuurproductie uit glucose en mannitol onder aerobe en anaerobe condities; zuurproductie uit lactose, maltose en glycerol onder aerobe condities; de eind pH en acetoinvorming; reductie van nitraten en splitsing van gelatine. De methoden waren dezelfde als aangegeven door Baird-Parker. Voor het onderzoek van fermentatie van suikers werd de buisjesmethode gebruikt.

**BEREIDING VAN EEN RUW TOXINEPREPARAAT.** Voor de bereiding van een ruw toxinepreparaat werd gebruik gemaakt van een kolf van 300 ml, die was afgesloten met een stop, waardoor twee glazen buisjes waren aangebracht. Todd-Hewitt bouillon (Difco) werd in navolging van de Waart (1964) als medium gekozen. Kolven met 50 ml bouillon werden beënt met 0,5 ml van een 18-uurs cultuur en vervolgens werd gedurende 3 minuten een mengsel van lucht en 30% CO<sub>2</sub> doorgeleid. De kolven werden afgesloten en 18 uur bebroed bij 37°C in een schudwaterbad. Bacteriën werden gecentrifugeerd en de bovenstaande vloeistof werd bij 4°C bewaard en binnen 24 uur getitreerd op α- en δ-toxine.

**TOXINETITRATIES.** De hemolytische activiteit van een toxinepreparaat werd bepaald door het uitvoeren van een toxinetitratie met konijne- en mense-

erythrocyten voor respectievelijk het  $\alpha$ - en  $\delta$ -toxine. Bloed werd afgenomen en gevoegd bij een gelijke hoeveelheid van een oplossing van Alsever en drie dagen bij 4°C bewaard (de Waart, 1964). Voor de titratie werd van driemaal gewassen erythrocyten een 2% suspensie gemaakt in een met fosfaat gebufferde zoutoplossing (0,155 M NaCl, 0,01 M fosfaat, pH 6,9). Vervolgens werd van het toxinepreparaat een verdunningsreeks van onverdund, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16 enz. gemaakt in 0,5 ml van de gebufferde zoutoplossing. Aan elke buis werd 0,5 ml van de erythrocytensuspensie toegevoegd. Een buisje zonder toxinen diende als controle. Een tweede buisje met 1 ml van de erythrocytensuspensie en 3 ml fosfaatbuffer in aqua dest. werd als maat voor 50% hemolyse gebruikt. De buisjes werden 1 uur bij 37°C geïncubeerd en vervolgens 3 minuten bij 1000 toeren gecentrifugeerd. De titersterkte werd opgegeven in aantallen M.H.D. (minimale hemolytische dosis). Aangenomen werd dat de verdunning die nog juist 50% hemolyse laat zien 1 M.H.D. bevat.

AGAR-GEL DIFFUSIE VOLGENS OUCHTERLONY. De techniek werd uitgevoerd zoals is aangegeven door Nowotny (1969). In de plaats van Ion agar werd Noble Agar (Difco) gebruikt.

PRODUCTIE VAN P-V LEUCOCIDINE. De condities voor een optimale productie van P-V leucocidine (leucocidine) zijn aangegeven door Gladstone en van Heyningen (1957) en Bänffer (1961). Het gebruik van CCY-medium (casamino acids, citrate, yeast diffusate) en een goede aeratie zijn van groot belang voor een hoge opbrengst. Bij de bereiding van het medium werd het voorschrift van Bänffer (1961) gevolgd. Het medium werd 30 minuten gesteriliseerd bij 105°C aangezien bij hogere temperaturen neerslagen ontstaan. Wanneer de leucocidineproductie van verschillende stammen werd vergeleken, werd altijd CCY-medium van dezelfde productie-datum gebruikt. Een goede aeratie werd bereikt door de leucocidineproductie te laten plaats vinden in een plastic weefselcultuurfles van 250 ml, die in een schudwaterbad bij 37°C in verticale stand werd geschud. Uit een 18 uren voorcultuur in CCY werd 0,3 ml overgebracht in een weefselcultuurfles waarin zich 3 ml CCY bevond. Na 8 uur schudden bij 37°C werd 30 ml CCY, voorverwarmd tot 37°C, aan de cultuur toegevoegd. Na 8 - 16 uur bebroeden

werd de cultuur bij 4°C gecentrifugeerd en de bovenstaande vloeistof werd binnen 24 uur onderzocht op leucocidine.

BEPALING VAN HET LEUCOCIDINE. Door leucocidine gedode leucocyten tonen microscopisch duidelijk waarneembare en kenmerkende veranderingen, die goed zijn te onderscheiden van niet door leucocidine veroorzaakte beschadiging zoals uitdroging of leucotoxische effecten van  $\alpha$ - en  $\delta$ -toxine. Deze veranderingen zijn: de cellen zijn intact maar hebben zich afgerond; de kern is rond en de granulae, voor zover nog aanwezig, liggen perifeer tegen de celmembraan aan. Gladstone en van Heyningen (1957) beschreven twee leucocidinebepalingen waarbij gebruik werd gemaakt van het boven beschreven effect van leucocidine op levende menselijke leucocyten.

De eerste en eenvoudigste methode is een titratie van het leucocidine die als het volgt werd uitgevoerd. Van het te onderzoeken toxinepreparaat werd een verdunningsreeks gemaakt. Een aantal dekglasjes werden elk van een druppel mensebloed voorzien, die uit een vingerprik werd verkregen. De dekglasjes werden vervolgens, om het bloed te laten stollen, op een filtreerpapier in een Petrischaal gedurende 15 minuten boven een waterbad van 37°C geplaatst. Inmiddels werd een druppel van elke toxineverdunding op een objectglas gebracht. Na het stollingsproces werd het stolsel met een pincet verwijderd en enkele malen gewassen in een gelatinefosfaatbuffer. Deze buffer werd als het volgt bereid: 5 g gelatine, 9,5 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3,6 g glucose, 2,72 g NaCl en 1,62 ml HCl 36% werd in 1000 ml aqua dest opgelost en 30 minuten gesteriliseerd bij 105°C. Voor gebruik werd de buffer 30 minuten bij 37°C verwarmd. Na het wassen blijven de levende leucocyten als een dunne film op het dekglasje achter. De dekglasjes werden nu met de zijde waarop zich de leucocytenfilm bevond op de druppels toxine geplaatst en afgesloten met warme paraffine. De objectglasjes werden 30 minuten bij 37°C geïncubeerd. Daarna werden de preparaten bekeken onder een fase-contrastmicroscop (objectief 40x). De titer werd opgegeven in aantallen MLeD (minimum leucocidal dosis). Onder de MLeD wordt verstaan de kleinste hoeveelheid leucocidine die bij menselijke leucocyten de voor leucocidine typische veranderingen laat zien. Als eindpunt van de titratie werd de hoogste verdunning genomen

waarbij meer dan de helft van de leucocyten de beschadiging door het leucocidine toonden.

De tweede methode berust op een toxinebepaling met een antitoxine als standaard (L+ bepaling). Onder de L+ dosis wordt verstaan de kleinste hoeveelheid leucocidine die met één eenheid antileucocidine in een totaal volume van 1 ml de dood van de menselijke leucocyt veroorzaakt. Voor de L+ bepaling werd van het toxine een verdunningsreeks met stappen van 20% gemaakt. Hiervan werden twee druppels gevoegd bij twee druppels antiserum. De gekozen verdunning van het antiserum was afhankelijk van de sterkte van het leucocidinepreparaat. Er werd namelijk eerst een MLeD bepaling gedaan en de relatie L+ dosis en MLeD is ongeveer 1: 500 (Gladstone en van Heyningen, 1957). In de regel werd gewerkt op een niveau van 0,1 - 0,005 I.U./ml. Een eigen anti-leucocidineserum werd gestandaardiseerd met het "International Reference Preparation of Anti-Staphylococcal P-V Leucocidin Serum" (Skegg en Anderson, 1969). Als eindpunt van de titratie werd die verdunning genomen die nog juist de typische dode leucocidinecellen liet zien.

De L+ bepaling heeft duidelijke voordelen boven de MLeD bepaling, aangezien het een gestandaardiseerde, kwantitatieve bepaling is, die bovendien minder temperatuurgevoelig is omdat het eventueel ontstane toxoid van het thermolabiele leucocidine wordt meebepaald. Bovendien zijn de omslagen scherper dan bij de MLeD bepaling.

ANTILEUCOCIDINE BEPALING. Een leucocidinepreparaat, verkregen van Dr. Bänffer, waarvan de sterkte in L+/ml bekend was, werd verdund tot 1 L+/ml. Van het te onderzoeken serum werd een verdunningsreeks van onverdund, 1/2, 1/4, 1/6, 1/8 enz. gemaakt. Van elke verdunning werden 2 standaarddruppels (0,025 ml) gevoegd bij 2 druppels van het leucocidine. Na menging en incubatie gedurende 30 minuten bij 37°C werd 1 druppel op een leucocytenfilm geplaatst. De bepaling is verder gelijk aan de MLeD bepaling. De hoogste verdunning waarin de typische leucocytenveranderingen nog ontbreken, werd als eindpunt van de titratie beschouwd. Als standaard werd een anti-leucocidineserum gebruikt, waarvan de titer in I.U./ml bekend was.

FAAGTYPERING. Zie hiervoor hoofdstuk 3.



HET INDUCEREN VAN MUTATIES MET ETHYLMETHAANSULFONAAT (EMS). EMS (Koch-Light) werd verdund met een zoutoplossing van de volgende samenstelling:

140 mg  $(\text{NH}_4)_2 \text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$   
1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$   
40 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$   
90 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
150 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   
5 l aq. dest.

Na het stellen van de pH (6,8) werd de oplossing gefiltreerd en door autoclaving gesteriliseerd. Voor het induceren van mutaties werd EMS 1/25 verdund met een 1/8 verdunning van het zoutmengsel. Vervolgens werd 1 ml EMS verdunning gevoegd bij 1 ml 18 uren cultuur. Het mengsel werd 2 uur bij 37°C geïncubeerd en gecentrifugeerd. Het sediment werd gewassen met een natriumthiosulfaatoplossing van 5% die tevoren werd gesteriliseerd door een Millipore-membraanfilter van 0,2 µm. Natriumthiosulfaat blokkeert het alkyleringsproces waardoor de mutatiegenese wordt gestopt (Bautz en Freese, 1960). Na centrifugering werd het sediment opgenomen in 2 ml vleesbouillon en vervolgens werd 0,125 ml overgebracht in 5 ml vleesbouillon. Bebroeding vond plaats bij 37°C gedurende 18 tot 36 uur tot voldoende groei was bereikt. Voor het oogsten van mutaties werden vier standaarddruppels (0,025 ml) van een geschikte verdunning gespreid op één of meerdere indicatorplaten. Het ideale aantal kolonies ligt tussen de 20 en 50 kolonies per plaat. Alleen voor de DNase agarplaat die een brede opheldering toont rond DNase-positieve kolonies is dit aantal lager namelijk tussen de 10 en 20 kolonies. Voor het kiezen van de juiste verdunning werd de troebeling van de cultuur gemeten in een spectrofotometer bij 650 µm en bij een OD die kleiner was dan 0,250. Onder deze voorwaarde is er een rechtlijnig verband tussen troebeling en aantal bacteriën (Michel, 1961). Van een standaardcurve kon direct het aantal kolonievormende eenheden (K.V.E./ml) worden afgelezen. De tellingen van de groeicurven zijn niet gelijk voor verschillende stammen, zodat voor elke stam een standaardcurve werd gemaakt. Standaardcurven werden

gemaakt door van een aantal 18 uren culturen een verdunningsreeks ( $1/2$ ,  $1/4$ ,  $1/8$ ,  $1/12$ ,  $1/16$ ,  $1/20$ ) te maken, de verdunningen door te meten in het traject van de OD van 0 - 250 en vervolgens het aantal bacteriën in de verdunningen te tellen volgens de methode van Miles en Misra (1938). De gevonden rechte regressielijn diende als standaard-curve. In de praktijk bleek er een tweezijdige fout van ongeveer 100% te bestaan zodat het toch nodig bleek twee verdunningen op de platen te spreiden. Wanneer meer dan drie eigenschappen tegelijk werden onderzocht werd eerst geënt op een schape-erythrocytenplaat. Na bebroeding werd deze plaat gerepliceerd op een aantal indicatorplaten.

## R E S U L T A T E N

### A. EEN ONDERZOEK NAAR DE EIGENSCHAPPEN VAN HONDERD S. AUREUS STAMMEN.

Een vergelijkend onderzoek naar de eigenschappen van S. aureus, geïsoleerd uit infectieus materiaal bij de mens en S. epidermidis is ondermeer ondernomen door Lack en Wailing (1954), Jacobs, Willis en Goodborn (1964) en Abramson en Friedman (1967). Uit deze onderzoeken is gebleken dat S. aureus biochemisch veel actiever is dan S. epidermidis. Om ervaring op te doen met de bepalingsmethoden van stafylokokkenenzymen werden honderd coagulase-positieve stafylokokken onderzocht op de aanwezigheid van een aantal factoren die met pathogeniteit en virulentie verband kunnen houden.

Honderd coagulase-positieve stafylokokkenstammen werden uit de neus geïsoleerd bij 343 ambulante patiënten die voor de eerste maal een polikliniek voor Inwendige Geneeskunde<sup>x</sup> bezochten. Patiënten die de voorafgaande zes maanden ziekenhuiscontact hadden gehad of met antibiotica waren behandeld, werden uitgesloten van het onderzoek. Het aantal dragers van S. aureus in de neus bedroeg in deze populatie 29%, hetgeen in overeenstemming is met de literatuur (Williams, 1967).

De stammen werden onderzocht op de aanwezigheid van vrij coagulase (buisjetest), gebonden coagulase (slide-test) en  $\alpha$ -,  $\beta$ - en  $\delta$ -toxine (methode volgens Elek). Productie van stafylokinase, DNase, tween 20- en tween 80-splitsend lipase, fosfatase en hyaluronidase werd onderzocht met plaatmethoden. Coagulase-productie werd ook onderzocht met een nieuwe plaatmethode, waarvoor verwezen wordt naar het appendix van dit proefschrift. In figuur 1 is te zien dat S. aureus, geïsoleerd

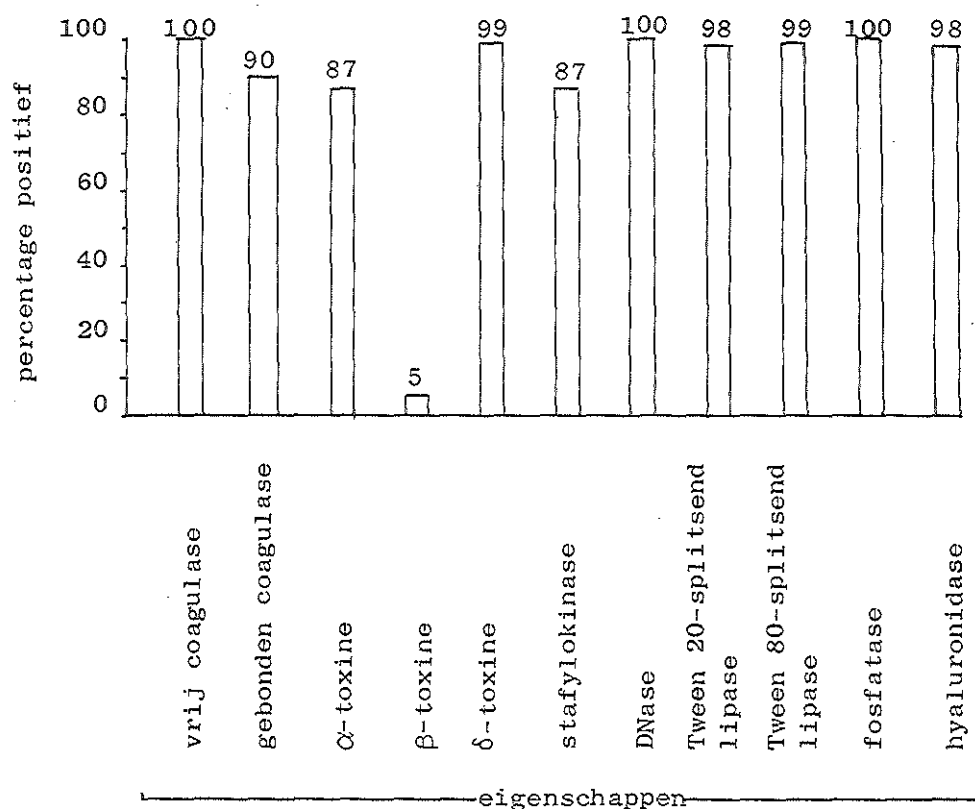


Fig. 1. De eigenschappen van 100 coagulase-positieve stafylokokken

uit niet-infectieus materiaal, een grote enzymactiviteit heeft. Afgezien van het  $\beta$ -toxine lijken de gevonden percentages niet te verschillen van die van bovenvermelde onderzoekers. Het percentage  $\beta$ -toxine-positieve stammen is laag vergeleken met de percentages opgegeven door Lack en Wailing (14%) en Jacobs en medewerkers (13%). Abramson en Friedman ge-

bruikten een andere methode waardoor vergelijking niet mogelijk is.

Alle plaatmethoden lieten duidelijk waarneembare verschijnselen zien, zodat ze gebruikt konden worden als indicatorplaten bij mutatie-experimenten.

#### B. HET SELECTEREN VAN S. AUREUS STAMMEN VOOR MUTATIEINDUCTIE.

Gezien het doel van dit onderzoek, namelijk verliesmutanten van een of meer S. aureus stammen te verwerven en deze in het dierexperiment met de moederstam te vergelijken, werd van te voren gezocht naar moederstammen die hiervoor geschikt leken. De stammen zouden alle eigenschappen moeten bezitten die in verband kunnen staan met pathogeniteit en virulentie van S. aureus. Ze zouden makkelijk herkenbaar moeten zijn of herkenbaar moeten worden gemaakt. Bovendien zou van te voren moeten worden nagegaan of ze virulent zijn voor de muis.

Zes coagulase-positieve stammen, die bij de mens ernstige infecties hadden veroorzaakt, werden onderzocht op productie van  $\alpha$ -,  $\beta$ - en  $\delta$ -toxine, leucocidine, stafylokinase, DNase, tween 20- en tween 80-splitsend lipase en hyaluronidase. Stam V2, geïsoleerd bij een patient met een stafylokokkensepsis en de stammen V4 en V5, isolaten uit een osteomyelitis, bleken alle onderzochte eigenschappen, behoudens het vermogen tot  $\beta$ -toxinevorming te bezitten. Stam V2 was penicilline- en streptomycine-resistent, stam V4 was gevoelig voor alle onderzochte antibiotica, stam V5 was alleen penicilline-resistent.

Om de herkenbaarheid van deze stammen te vergroten werd geprobeerd novobiocine-resistente varianten te isoleren. Resistentie voor dit weinig gebruikt antibioticum werd als merkteken gekozen, omdat het snel optreedt. Omdat dit antibioticum weinig wordt gebruikt is resistentie hiertegen vermoedelijk zeldzaam. Dit werd nagegaan door 50 coagulase-positieve stafylokokken te onderzoeken. Novobiocine-resistente stammen werden niet gevonden. Ook coagulase-negatieve stafylokokken zijn vrijwel altijd gevoelig voor dit antibioticum, omdat bij ongeveer 500 onderzochte stammen slechts 1-2% novobiocine-resistent bleek te zijn (persoonlijke mededeling van Dr. C.P.A.

van Boven).

Novobiocine-resistente varianten werden geselecteerd door de stammen te enten in vijf buizen met 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 en 0,5  $\mu$ g novobiocine-natrium per ml. Na 18 uur bebroeden bij 37°C werd overgeënt vanuit een buis met de hoogste concentratie novobiocine waarin groei aanwezig was, in een zelfde reeks buizen met 0,5, 1,0, 5,0 en 10  $\mu$ g per ml. Varianten, resistent voor 10  $\mu$ g per ml werden bij het eerste experiment verworven. De stammen waren nu gemakkelijk herkenbaar, aangezien bij een resistentiebepaling bacteriegroei optrad tot aan de rand van een 5  $\mu$ g novobiocine-bevattend schijfje.

De stammen werden vervolgens onderzocht op hun virulentie voor de muis. Hill (1968, 1969) toonde in de celwand van sommige S. aureus stammen een mucopeptide aan dat een agressinewerking heeft. Uit zijn experimenten bleek ondermeer dat deze stammen een lesie geven, wanneer  $10^6$  K.V.E. (kolonie-vormende eenheden) worden ingespoten. De minimale lesie-vormende dosis van agressine-negatieve stammen, zoals stam Wood 46, bleek hoger te zijn. Stam V2, V4, V5 en Wood 46 werden op hun virulentie voor de muis onderzocht door groepjes Swiss-muizen van 12 weken subcutaan in te spuiten met  $10^6$  K.V.E. Voor de techniek wordt verwezen naar hoofdstuk 4. Een pustel, voelbaar abscesje of necrotisch gebied kleiner dan een 0,5 cm werd genoteerd als 1. Necrotische gebieden groter dan 0,5 cm werden genoteerd als 2.

Tabel 1. Lesiescore 48 uur na subcutane injectie van S. aureus stammen.

STAM	AANTAL MUIZEN	INOCULUM IN K.V.E.	AANTAL MUIZEN MET LESIESCORE			GEMIDDELDE LESIESCORE
			0	1	2	
V2	5	$6.1 \cdot 10^5$	0	5	0	1,0
V4	5	$5.8 \cdot 10^5$	0	3	2	1,4
V5	5	$8.4 \cdot 10^5$	1	4	0	0,8
Wood 46	5	$8.8 \cdot 10^5$	5	0	0	0

Uit tabel 1 blijkt dat de stammen V2, V4 en V5 virulent zijn voor de muis. De stammen leken te voldoen aan de bovengenoemde voorwaarden en werden geschikt geacht voor mutatieinductie.

#### C. ORIENTEREND ONDERZOEK NAAR HET MUTATIEINDUCEREND VERMOGEN VAN ETHYLMETHAANSULFONAAT BIJ DE STAMMEN V2, V4 EN V5.

Zoals in de methoden is aangegeven werd een met EMS behandelde cultuur met een natriumthiosulfaatoplossing gewassen en van verse bouillon voorzien. Om de eventuele mutaties tot expressie te laten komen werd 18 tot 36 uur bij 37°C bebroed. In de regel was er na 24 uur goede groei. In een volgroeide cultuur werd vervolgens op indicatorplaten naar mutanten gezocht. Het onderzoek naar verliesmutanten voor  $\alpha$ -toxine vond plaats op schape- of konijne-erythrocyten bevattende platen. Deze voedingsbodems maken geen onderscheid tussen de lytische activiteit van  $\alpha$ - en  $\delta$ -toxine. Indien een kolonie geen of verminderde lysis toonde, moest later nog worden uitgemaakt voor welk toxine een verliesmutatie was opgetreden.

Wanneer op de indicatorplaten fenotypisch veranderde kolonies werden waargenomen, werden ze eenmaal overgeënt en opnieuw onderzocht. Wanneer na overenten de verandering constant bleek te zijn, werd het resistentiespectrum bepaald. Indien dit niet overeenkwam met de moederstam, werd de stam als contaminant beschouwd. Vervolgens werden de stammen enkele malen overgeënt en onderzocht op de volgende eigenschappen van S. aureus: pigmentvorming op schapebloedagar, faagpatroon, gebonden en vrij coagulase, hemolysepatroon volgens de Elek-methode, stafylokinase, DNase, tween 80- en tween 20-splitsend vermogen, fosfatase, hyaluronidase en een aantal kenmerken van de stafylokokkenstofwisseling volgens de methoden zoals aangegeven door Baird-Parker. Sommige mutanten, die om uiteenlopende redenen van belang leken, werden nog onderzocht op productie van leucocidine en groeisnelheid in vitro. Bij sommige mutanten werd een uitgebreider kwalitatief en kwantitatief onderzoek gedaan naar productie van  $\alpha$ - en  $\delta$ -toxine.

Alle mutanten die in dit proefschrift vermeld worden, zijn aangeduid met een letter en een cijfer. De letter duidt op het mutatieinductie-experiment. Het cijfer is het rangnummer.

#### MUTATIEINDUCTIE VAN STAM V2.

Stam V2 (faagpatroon 80/81) werd vijfmaal geïnduceerd met EMS. Er werd gezocht naar verliesmutanten voor coagulase (5x),  $\alpha$ -toxine (3x), stafylokinase (2x), DNase (2x) en fosfatase (1x). Verliesmutanten voor coagulase (330, 430, 300, 560, 800)<sup>x</sup>, stafylokinase (320, 420), DNase (520, 560) en fosfatase (520) werden niet gevonden. In twee inductie-experimenten, waarbij gezocht werd naar verliesmutanten voor  $\alpha$ -toxine (330, 420), konden mutanten niet worden waargenomen. In het derde experiment (690) werden twee kolonies opgemerkt die verminderde lysis toonden. Bij bepaling van het hemolysepatroon volgens de Elek-methode bleken deze stammen het vermogen om  $\delta$ -toxine te maken te hebben verloren. Het faagpatroon van deze stammen was gelijk aan die van de moederstam.

#### MUTATIEINDUCTIE VAN STAM V5.

Stam V5 (faagpatroon: N) werd driemaal met EMS geïnduceerd. Er werd gezocht naar verliesmutanten voor coagulase (3x),  $\alpha$ -toxine (3x),  $\delta$ -toxine (1x) en DNase (2x).

Eén inductie-experiment, waarbij gezocht werd naar verliesmutanten voor coagulase (240) en  $\alpha$ -toxine (420) leverde geen mutanten op. Twee inductie-experimenten (T, P) waren succesvol. In tabel 2 zijn het aantal op een bepaalde eigenschap onderzochte kolonies en de gevonden mutanten weergegeven. De in tabel 2 opgenomen mutanten werden ook gefaagtypeerd en onderzocht op leucocidineproductie. Alle mutanten hadden hetzelfde faagpatroon als de moederstam of waren niet te typeren met de 27 fagen van het faagtyperingssysteem. Wegens een identiek resistentie-spectrum voor antibiotica werden ze toch als mutanten beschouwd.

Wanneer een bepaalde eigenschap bij een mutant niet meer kon worden aangetoond, dan geldt dit slechts voor de bepalingmethode die werd gebruikt. Het blijft dus mogelijk dat de synthese van een bepaald eiwit slechts in kwantitatief opzicht is veranderd of dat er een structureel

Tabel 2. Aantal onderzochte kolonies en gevonden mutanten bij mutatie-inductie van stam V5 met EMS.

MUTATIE- EXPERIMENT	EIGENSCHAP WAAROP WERD ONDERZOCHT	AANTAL KOLONIES	MUTANTEN
T	coagulase	260	T1(Coag <sup>1</sup> , $\alpha$ Tox <sup>-</sup> , Leuc <sup>1</sup> ) <sup>x</sup> T8(Coag <sup>1</sup> , $\alpha$ Tox <sup>-</sup> , Kin <sup>-</sup> , DNase <sup>1</sup> , Leuc <sup>-</sup> , ØR) T7(Coag <sup>1</sup> , $\alpha$ Tox <sup>1</sup> , Kin <sup>1</sup> , DNase <sup>1</sup> , Leuc <sup>1</sup> , ØR, Glu <sup>-</sup> , Mtl <sup>-</sup> , Lac <sup>-</sup> , Mal <sup>-</sup> )
	$\alpha$ -toxine	180	T24(Coag <sup>1</sup> , $\alpha$ Tox <sup>-</sup> , Leuc <sup>1</sup> ) <sup>x</sup>
	DNase	170	mutaties niet gevonden
P	coagulase	1510	P11(Coag <sup>1</sup> ) P10(Coag <sup>1</sup> , $\alpha$ Tox <sup>-</sup> , DNase <sup>1</sup> , Leuc <sup>1</sup> , Gelat <sup>-</sup> ) P14(Coag <sup>-</sup> , BC <sup>-</sup> , $\alpha$ Tox <sup>-</sup> , $\delta$ Tox <sup>1</sup> , Kin <sup>-</sup> , DNase <sup>-</sup> , Fosf <sup>-</sup> , Hya <sup>-</sup> , Leuc <sup>-</sup> , Gelat <sup>-</sup> , ØR) P16(Coag <sup>-</sup> , BC <sup>-</sup> , $\alpha$ Tox <sup>-</sup> , $\delta$ Tox <sup>-</sup> , Kin <sup>-</sup> , DNase <sup>-</sup> , Tw20 <sup>-</sup> , Tw80 <sup>-</sup> , Fosf <sup>-</sup> , Hya <sup>-</sup> , Leuc <sup>1</sup> , Gelat <sup>-</sup> , ØR)

Symbolen: Coag = vrij coagulase;  $\alpha$ Tox =  $\alpha$ -toxine;  $\delta$ Tox =  $\delta$ -toxine; Kin = stafylokinase; DNase = deoxyribonuclease; Tw20 = tween 20-split-send lipase; Tw80 = tween 80-split-send lipase; Fosf = fosfatase; Hya = hyaluronidase; Leuc = P-V leucocidine; ØR = faagresistent; Gelat = gelatinase; Glu = glucose; Mtl = mannitol; Lac = lactose; Mal = maltose; - betekent dat activiteit niet aantoonbaar is of fermentatie niet kan worden waargenomen; 1 (leaky) betekent verminderde activiteit.

<sup>x</sup> meerdere kolonies van dit fenotype gevonden.



veranderd eiwit wordt gesynthetiseerd, waardoor geen activiteit meer wordt waargenomen. Indien met de gebruikte methoden verminderde activiteit werd gevonden, werden deze mutanten als "leaky" aangegeven. Zoals in tabel 2 is te zien werd één monomutant voor een gedeeltelijk verlies van coagulaseproductie (P11) gevonden. De andere mutanten toonden verlies voor meer dan één eigenschap. Productie van leucocidine was, na 14 uur bebroeden, bij al deze mutanten verminderd (0 tot 10 MLeD), terwijl de moederstam V5 400 MLeD maakte. De stammen P14 en P16, die een groot aantal eigenschappen verloren hadden, hadden een zichtbaar verminderde groeisnelheid in bouillon.

#### MUTATIEINDUCTIE VAN STAM V4.

Stam V4 (faagpatroon: 29) werd viermaal geïnduceerd en onderzocht op verliesmutanten voor coagulase (4x),  $\alpha$ -toxine (4x) en DNase (2x). Twee inductie-experimenten waarbij gezocht werd naar verliesmutanten voor coagulase (160, 320),  $\alpha$ -toxine (480, 320) en DNase (180, 320) gaven geen mutaties. In tabel 3 zijn de mutanten die in de inductie-experimenten B en BB werden gevonden, weergegeven. Alle mutanten werden ook onderzocht op leucocidineproductie en werden gefaagtypeerd. De mutanten hadden hetzelfde faagpatroon of waren niet te typeren. Stabiele monomutanten werden gevonden voor verlies van  $\alpha$ -toxine en een gedeeltelijk verlies van coagulaseproductie. De stammen B29, B22, BB15 en BB1, die een groot aantal eigenschappen verloren hadden, hadden een zichtbaar verminderde groeisnelheid in bouillon.

#### CONCLUSIE.

Bij inductie van stam V2 werden slechts sporadisch mutanten gevonden. Stam V5 en V4 leken gemakkelijker te muteren. Er werd een grote variabiliteit gevonden waarin geen systeem te ontdekken was. Sommige mutanten, die vele eigenschappen verloren hadden, groeiden langzamer in bouillon dan de moederstam. In een aantal experimenten werden meerdere verliesmutanten met hetzelfde fenotype gevonden. Vermoedelijk zijn deze door deling ontstaan. Aangezien stam V4 een stabiele monomutant voor verlies

Tabel 3. Aantal onderzochte kolonies en gevonden mutanten bij mutatie-inductie van stam V4 met EMS.

MUTATIE- EXPERIMENT	EIGENSCHAP WAAROP WERD ONDERZOCHT	AANTAL KOLONIES	MUTANTEN
B	coagulase	410	B1 (Coag <sup>1</sup> ) <sup>x</sup>
	α-toxine	500	B21(αTox <sup>-</sup> )
			B29(Coag <sup>1</sup> , αTox <sup>-</sup> , DNase <sup>1</sup> , Leuc <sup>1</sup> )
			B22(αTox <sup>-</sup> , Kin <sup>-</sup> , DNase <sup>1</sup> , Hya <sup>1</sup> , Leuc <sup>1</sup> )
			B17(Coag <sup>1</sup> , αTox <sup>1</sup> , δ Tox <sup>1</sup> , Kin <sup>1</sup> , DNase <sup>1</sup> , Leuc <sup>1</sup> )
BB	coagulase	680	BB14(aTox <sup>-</sup> , Kin <sup>1</sup> )
			BB12(αTox <sup>1</sup> , δ Tox <sup>-</sup> , Leuc <sup>-</sup> )
			BB16(αTox <sup>-</sup> , δ Tox <sup>-</sup> , DNase <sup>1</sup> , Leuc <sup>1</sup> )
			BB15(Coag <sup>1</sup> , αTox <sup>-</sup> , δ Tox <sup>1</sup> , Kin <sup>1</sup> , DNase <sup>1</sup> , Leuc <sup>1</sup> )
			BB1 (Coag <sup>-</sup> , αTox <sup>-</sup> , DNase <sup>-</sup> , Kin <sup>-</sup> , Tw80 <sup>-</sup> , Fosf <sup>-</sup> , Hya <sup>-</sup> , Leuc <sup>-</sup> , Gelat <sup>-</sup> , Mtl <sup>-</sup> , witte kolonies)

Symbolen: als in tabel 2

x meerdere kolonies van dit fenotype gevonden.

van α-toxine had gegeven, werd deze uitgekozen voor verdere mutatieinductie-experimenten. Stam V2, die vanwege het faagpatroon 80/81 aanvankelijk de voorkeur had, werd wegens de vermoedelijk lagere mutatiefrequentie niet gekozen.

#### D. MUTATIEINDUCTIE VAN STAM V4 VOOR HET VERWERVEN VAN MONOMUTANTEN.

Stam V4 werd in totaal 43 maal geïnduceerd. De inductie-experimenten waren speciaal gericht op het verwerven van mutanten die slechts één of eventueel twee eigenschappen verloren hadden. De gevonden mutanten werden niet altijd volledig onderzocht op alle eigenschappen van S. aureus, wanneer bleek dat er vele eigenschappen verloren waren gegaan. Alle mutanten die in verband met de vraagstelling van dit proefschrift relevant werden geacht, werden volledig onderzocht op alle eigenschappen van S. aureus en werden gefaagtypeerd.

#### VERLIESMUTANTEN VOOR COAGULASE.

Er werd 6 maal gezocht naar verliesmutanten voor coagulase ( $M = 360$   $R = 160-680$ )<sup>x</sup>. Monomutanten voor verlies van coagulase werden slechts in één experiment gevonden. Een vertegenwoordiger hiervan, namelijk stam B1(Coag<sup>1</sup>) zal in het dierexperiment worden onderzocht. Ofschoon aanvankelijk de coagulase buisproef geheel negatief was, werden later toch aanwijzingen gevonden dat deze stam zeer geringe hoeveelheden coagulase produceerde. Stam V4 gaf volledige stolling na 2 uur, stam B1(Coag<sup>1</sup>) bleek na 24 uur wel een klein stolseltje te vormen.

#### VERLIESMUTANTEN VOOR $\alpha$ - EN $\delta$ -TOXINE.

Mutatieinductie waarbij gezocht werd naar verliesmutanten voor  $\alpha$ -toxine vond 12 maal plaats ( $M = 160$   $R = 300-1500$ ). Monomutanten voor verlies van  $\alpha$ -toxine werden in drie experimenten gevonden. Cultuurfiltraten van deze stammen bleken bij nader onderzoek, zoals uiteengezet zal worden worden, nog enige  $\alpha$ -toxineactiviteit te tonen, zodat ze als "leaky" worden aangegeven. De stammen B21( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>) en BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>), die hiervan vertegenwoordigers zijn, zullen in het dierexperiment worden onderzocht. Ook stam BT22( $\alpha$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) zal in het dierexperiment met de moederstam worden vergeleken.

Naar  $\delta$ -toxine verliesmutanten werd aanvankelijk 13 maal gezocht ( $M = 310$   $R = 200-750$ ). Eénmaal werd een  $\delta$ -toxine verliesmutant M8 gevonden

die helaas minder leucocidine maakte dan de moederstam. Hetzelfde was het geval bij drie  $\delta$ -toxine verliesmutanten die in drie mutatieinductie-experimenten, waarbij gezocht werd naar  $\alpha$ -toxine verliesmutanten, werden gevonden. Deze stammen toonden op konijne-erythrocyten bevattende platen verminderde lysis wat bij nader onderzoek bleek te berusten op verlies van  $\delta$ -toxine. In de hoop een monomutant voor verlies van  $\delta$ -toxine te vinden werd nog vijf maal met EMS geïnduceerd, waarbij ongeveer 600 kolonies per experiment werden onderzocht op verlies van  $\delta$ -toxine. Drie experimenten leverden verliesmutanten voor  $\delta$ -toxine op. Helaas hadden al deze mutanten een lage leucocidineproductie. De leucocidineproductie van de bovengenoemde  $\delta$ -toxine verliesmutanten varieerde van 4 tot 10 MLeD terwijl de moederstam 200 MLeD produceerde.

Naast de boven beschreven mutanten werden in sommige inductie-experimenten verliesmutanten gevonden die alleen in kwantitatief opzicht leken te verschillen. Soms waren dit monomutanten, soms echter stammen die in meer dan één eigenschap waren veranderd.

#### VERLIESMUTANTEN VOOR STAFYLOKINASE.

Er werd 12 maal gezocht naar verliesmutanten voor stafylokinase ( $M = 240$   $R = 100-500$ ). Tweemaal werd een monomutant gevonden, namelijk de stammen BF34( $Kin^-$ ) en BE5( $Kin^-$ ). Het faagpatroon van deze stammen was 29/+ (81). Dit verschil met de moederstam V4 (29) zal in hoofdstuk 3 nader worden onderzocht. Stam BF34( $Kin^-$ ) zal in het dierexperiment met de moederstam worden vergeleken.

#### VERLIESMUTANTEN VOOR DNASE, TWEEN-SPLITSEND LIPASE, HYALURONIDASE EN FOSFATASE.

Monomutanten voor verlies van DNase werden in 22 inductie-experimenten niet gevonden ( $M = 250$   $R = 180-500$ ). De stammen die als DNase-negatieve kolonies werden afgenomen, bleken bij verder onderzoek vrijwel alle of zelfs alle eigenschappen te hebben verloren. Ze vormden witte kolonies op bloedagar en waren faagresistent. Hetzelfde gold voor de verliesmutanten voor hyaluronidase die in de 11 inductie-experimenten werden gevonden ( $M = 250$   $R = 230-500$ ). Slechts tweemaal werd gezocht naar ver-

liesmutanten voor fosfatase (400 en 500 kolonies) en tweek-splitsend lipase (aantal kolonies 400 en 500). Mutaties werden niet gevonden.

#### VERLIESMUTANTEN VOOR P-V LEUCOCIDINE.

Een plaatmethode voor het testen van P-V leucocidine (leucocidine) was niet beschikbaar. In navolging van Bänffer (1961) werd geprobeerd leucocidine-positieve van leucocidine-negatieve stammen te onderscheiden, door de stammen loodrecht te enten op een filtreerpapiertje dat bevochtigd was met anti-leucocidineserum. Bij leucocidine-positieve stammen werd meer dan één precipitatielijng gevormd. Deze lijntjes kunnen worden toegeschreven aan de twee antigene componenten ("fast" en "slow") van het leucocidine. Het aantal lijntjes zal bovendien afhankelijk zijn van de specificiteit van het antiserum. Eerst werd onderzocht of de methode bruikbaar was voor het selecteren van verliesmutanten.

Het anti-leucocidineserum werd verkregen door een konijn (Vlaamse reus) te immuniseren met een leucocidinepreparaat (80L+/ml) dat door de firma Organon (Oss) was bereid volgens methoden die door Bänffer zijn beschreven (1961). Een dosis leucocidine werd in 3 ml Freund-adjuvans geëmulgeerd en intramusculair ingespoten. In tabel 4 zijn het immunisatieschema en de verkregen anti-leucocidinetiters bij konijn 249

Tabel 4. Immunisatie van konijn 249 met leucocidine en de verkregen anti-leucocidinetiters (A-L titer).

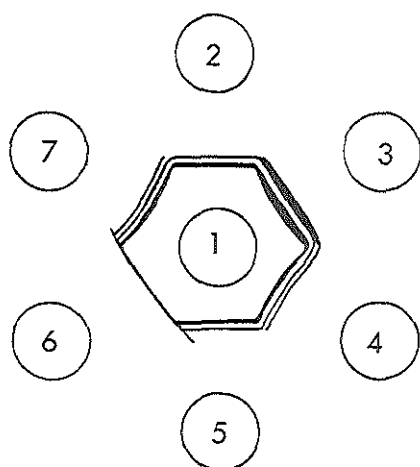
DATUM	4/1	5/1	20/3	8/4	21/4	25/4	16/6	28/9	15/10
DOSIS IN L+	-	10	20	30	-	30	-	40	-
A-L TITER IN I.U./ML	<1	-	-	-	10	-	40	10	40
BLOEDAFNAME							40 ml		60 ml

weergegeven. De anti-leucocidineëenheden zijn uitgedrukt in I.U./ml. Deze eenheden werden verkregen door elke bepaling met een standaardserum

te vergelijken (International Reference Preparation of Anti-Staphylococcal P-V Leucocidin Serum, zie hierover Skegg en Anderson, 1969). Het anti-leucocidineserum werd in kleine hoeveelheden bij  $-20^{\circ}\text{C}$  bewaard.

Vervolgens werden vaste voedingsbodems bereid bestaande uit CCY medium met 1½% Noble Agar(Difco). Het medium werd 30 minuten bij  $105^{\circ}\text{C}$  gesteryliseerd, waarna platen met een dikte van ongeveer 3-4 mm werden gegoten. Een oriënterend onderzoek werd gedaan met de stam V8, die veel leucocidineproduceert, de moederstam V4 en de mutanten B21( $\alpha\text{Tox}^1$ ), BB12( $\alpha\text{Tox}^1$ ,  $\delta\text{Tox}^-$ ,  $\text{Leuc}^-$ ) en BB16( $\alpha\text{Tox}^-$ ,  $\delta\text{Tox}^-$ ,  $\text{DNase}^1$ ,  $\text{Leuc}^1$ ). De stammen werden van een verse cultuur op bloedagar loodrecht geënt op een filtreerpapiertje dat met verschillende verdunningen van het antiserum was bevochtigd. De platen werden 18 uur bebroed bij  $37^{\circ}\text{C}$ . Vervolgens werden de platen 24-48 uur bij kamertemperatuur geplaatst, totdat duidelijke precipitatielijntjes zichtbaar werden. Stam V8 en V4 toonden twee precipitatielijnen namelijk een smalle, scherpe lijn, die het dichtst bij het filtreerpapier lag en een bredere, vaag begrensde lijn. Stam B21( $\alpha\text{Tox}^1$ ) verschilde niet duidelijk van V4. Bij de stammen BB12( $\alpha\text{Tox}^1$ ,  $\delta\text{Tox}^-$ ,  $\text{Leuc}^-$ ) en BB16( $\alpha\text{Tox}^-$ ,  $\delta\text{Tox}^-$ ,  $\text{DNase}^1$ ,  $\text{Leuc}^1$ ) ontbraken de precipitatielijnen. De lijnen waren het duidelijkst bij gebruik van onverdund of 1/2 verdund serum.

De specificiteit van het antiserum werd nader onderzocht met behulp van agar-gel diffusie volgens Ouchterlony. Ruw leucocidinepreparaten van de stammen V8, V4, B21( $\alpha\text{Tox}^1$ ) en BB16( $\alpha\text{Tox}^-$ ,  $\delta\text{Tox}^-$ ,  $\text{DNase}^1$ ,  $\text{Leuc}^1$ ) werden als antigeen gebruikt. Verschillende verdunningen van pre-immuun serum van konijn 249, eigen anti-leucocidineserum, standaard anti-leucocidineserum en een anti- $\alpha$ -toxineserum (Burroughs en Wellcome) werden onderling vergeleken. Precipitatielijntjes werden met pre-immuun serum niet waargenomen. Het diffusiepatroon van het ruwe leucocidinepreparaat van de stammen V4, V8 en B21( $\alpha\text{Tox}^1$ ) met de bovengenoemde sera was identiek. Voor het antigeen van stam V4 is dit schematisch weergegeven in figuur 1. Het standaard anti-leucocidineserum vormde met het antigeen twee lijntjes. Deze werden toegeschreven aan de slow en fast component van het leucocidine. Het eigen onverdunde anti-leucocidineserum gaf twee intensieve lijnen. In de verdunningen ontstonden drie lijnen, waarvan er twee identiteit toonden met het standaardserum. Het anti- $\alpha$ -toxine-



- 1 = antigeen (cultuurfiltraat van een 8 uurs cultuur in CCY)
- 2 en 5 = standaard anti-leucocidineserum (15 I.U./ml)
- 3 = eigen anti-leucocidineserum verdund tot 15 I.U./ml
- 4 en 7 = eigen anti-leucocidineserum verdund tot 3 I.U./ml
- 6 = anti- $\alpha$ -toxineserum (75 I.U./ml)

Figuur 1. Schematische voorstelling van het diffusiepatroon in agar-gel van een ruw leucocidinepreparaat van stam V4 als antigeen, anti-leucocidineserum en anti- $\alpha$ -toxineserum.

serum gaf een intensieve lijn die niet overeenkwam met de lijnen van de anti-leucocidinesera. Het eigen serum leek dus een onbekende specifieke component te bezitten. Anti- $\alpha$ -toxine vormde bij immunodiffusie met het antigeen van stam B21 ( $\alpha\text{Tox}^1$ ) eenzelfde precipitatielijns als met het antigeen van de moederstam V4. Er werd verondersteld dat deze mutant mogelijk een veranderd  $\alpha$ -toxine produceerde. Bij immunodiffusie van het antigeen van stam BB16 ( $\alpha\text{Tox}^-$ ,  $\delta\text{Tox}^-$ ,  $\text{DNase}^1$ ,  $\text{Leuc}^1$ ) en de twee anti-leucocidinesera werden precipitatielijntjes niet waargenomen. Er werd alleen een zwakke, vage lijn gezien met het anti- $\alpha$ -toxineserum. Het leek dus aannemelijk dat de twee lijnen die op de CCY-platen waren gezien, leucocidinelijnen waren.

Vervolgens werd 5 maal geïnduceerd op leucocidine-verliesmutaties. Per mutatie-experiment werden 100 kolonies onderzocht door coagulase-positieve kolonies van een coagulaseplaat over te enten op CCY-platen, waarop een stripje filtreerpapier, gedrenkt in anti-leucocidineserum, was gelegd. De methode bleek niet erg betrouwbaar, aangezien er soms verschillen in de precipitatielijnen werden gezien, terwijl bij een MLeD bepaling geen verschil werd gevonden. In de vierde mutatiereeks werden

echter twee kolonies gevonden die in het geheel geen lijnen vormden. Deze twee stammen L62 en L80 produceerden slechts 5 MLeD leucocidine, terwijl de moederstam V4 200 MLeD maakte. Stam L62 werd verder onderzocht en toonde geen verschillen in andere eigenschappen. Er bleek wel een klein verschil in faagpatroon te bestaan. Het faagpatroon was 29/+ (N). Dit zal in hoofdstuk 3 nader worden onderzocht.

#### CONCLUSIE.

Van stam V4 werden stabiele verliesmutanten gevonden die maar in één eigenschap van de moederstam leken te verschillen. Deze monomutanten voor verlies van vrij coagulase,  $\alpha$ -toxine, stafylokinase en P-V leucocidine zullen in het dierexperiment met de moederstam worden vergeleken. Verlies van  $\delta$ -toxine ging steeds gepaard met een verminderde productie van leucocidine. Tijdens het zoeken naar monomutanten werden varianten gevonden die meer dan één eigenschap verloren hadden. In tabel 3 zijn enkele voorbeelden hiervan te zien. Afgezien van het gecombineerde verlies voor  $\delta$ -toxine en een verminderde leucocidineproductie kon geen systeem worden aangetoond. Het viel alleen op dat stammen die vele eigenschappen verloren hadden, op bloedagar soms het aspect van een S. epidermidis hadden gekregen. Deze stammen waren ook niet typeerbaar met de 27 fagen van het faagtyperingsstelsel voor S. aureus. De mogelijkheid dat deze stammen contaminanten waren, kon niet met zekerheid worden uitgesloten, al werd dit onwaarschijnlijk gemaakt door de overeenkomst in resistentiespectrum. Een onderzoek naar de aard van deze mutaties werd niet ondernomen.

#### E. DE GROEISNELHEID VAN STAFYLOKOKKENSTAMMEN.

Alle stammen die in het dierexperiment zullen worden gebruikt, werden onderzocht op de groeisnelheid in vitro. Dit onderzoek werd ondernomen omdat een lagere groeisnelheid een oorzaak zou kunnen zijn voor vermindering van productie van een extracellulair toxine en bovendien de virulentie zou kunnen beïnvloeden. Onderzocht werden alle monomutanten,



stam BT22( $\alpha\text{Tox}^-$ ,  $\text{Leuc}^1$ ), BS36( $\delta\text{Tox}^-$ ,  $\text{Leuc}^1$ ), CV4(-B,A,F), een variant van stam V4, die genezen is van alle profagen (zie hoofdstuk 3), stam Wood 46 en een S. epidermidis S2020. Bovendien werden nog onderzocht de mutanten B29( $\text{Coag}^1$ ,  $\alpha\text{Tox}^-$ ,  $\text{DNase}^1$ ,  $\text{Leuc}^1$ ) en BB16( $\alpha\text{Tox}^-$ ,  $\delta\text{Tox}^-$ ,  $\text{DNase}^1$ ,  $\text{Leuc}^1$ ). Laatstgenoemde mutanten, die meer dan één eigenschap verloren hadden, werden onderzocht omdat bij deze en andere gelijksoortige mutanten de indruk was verkregen dat ze ook minder snel groeiden dan de moederstam.

Een 16 uurs cultuur in bouillon die ongeveer  $3 \cdot 10^8$  K.V.E./ml bevatte, werd verdund tot  $3 \cdot 10^3$  K.V.E./ml. Vervolgens werd 100 ml bouillon beënt met  $3 \cdot 10^3$  K.V.E. en bebroed bij  $37^\circ\text{C}$  in een waterbad. Het aantal bacteriën werd om het uur geteld volgens de methode van Miles en Misra (1938). De logaritme van het aantal bacteriën werd uitgezet tegen de tijd. De groeisnelheid werd vervolgens berekend zoals is aangegeven door Meynell en Meynell (1965) volgens de formule:

$$K = \frac{\log N_t - \log N}{T}$$

waarin K de groeiconstante, N het aantal bacteriën en T (en t) de tijd in uren is. Uit de waarde van K werd de gemiddelde generatietijd (G), ook wel verdubbelingstijd genoemd, berekend volgens de formule:

$$G = \frac{0,301}{K}$$

De formule voor de K waarde geldt alleen in het rechte gedeelte van de groeicurve. Van alle stammen werden groeicurven verkregen die rechtlijnig verliepen tussen 4 en 7 uur. In tabel 5 zijn de K waarden en de gemiddelde generatietijd (G) in minuten weergegeven.

#### CONCLUSIE.

Alle monomutanten, stam BT22( $\alpha\text{Tox}^-$ ,  $\text{Leuc}^1$ ), BS36( $\delta\text{Tox}^-$ ,  $\text{Leuc}^1$ ) en de variant CV4(-B,A,F) hebben in vitro dezelfde groeisnelheid als de moederstam V4. Twee mutanten die meer dan twee eigenschappen verloren

Tabel 5. De groeiconstante K en de gemiddelde generatietijd in minuten (G/M) van een aantal stafylokokkenstammen.

STAM <sup>x</sup>	K	G/M
V4	0.62	29
B1(Coag <sup>1</sup> )	0.62	29
B21( $\alpha$ Tox <sup>1</sup> )	0.63	29
BH5( $\alpha$ Tox <sup>1</sup> )	0.65	28
BT22( $\alpha$ Tox <sup>-</sup> , Leuc <sup>1</sup> )	0.63	29
BS36( $\delta$ Tox <sup>-</sup> , Leuc <sup>1</sup> )	0.62	29
L62(Leuc <sup>1</sup> )	0.63	29
B29(Coag <sup>1</sup> , $\alpha$ Tox <sup>-</sup> , DNase <sup>1</sup> , Leuc <sup>1</sup> )	0.42	43
BB16( $\alpha$ Tox <sup>-</sup> , $\delta$ Tox <sup>-</sup> , DNase <sup>-</sup> , Leuc <sup>1</sup> )	0.48	38
CV4(-B,A,F) <sup>+</sup>	0.64	28
Wood 46	0.63	29
S2020 <sup>‡</sup>	0.47	38

x symbolen als in tabel 2

+ faagvrije variant van stam V4

‡ *S. epidermidis*

hadden, bleken een lagere groeisnelheid te hebben in dezelfde orde van grootte als *S. epidermidis*.

#### F. PRODUCTIE VAN $\alpha$ - EN $\delta$ -TOXINE DOOR MOEDERSTAM EN VERLIESMUTANTEN.

$\alpha$ -Toxine heeft een sterke activiteit op konijne-erythrocyten. Mense-erythrocyten zijn volgens Bernheimer (1968) ongeveer een factor 100 ongevoeliger. Verwarming gedurende 30 minuten tot 60°C maakt  $\alpha$ -toxine onwerkzaam. Het toxine is te neutraliseren met anti- $\alpha$ -toxine. De lytische

activiteit van  $\delta$ -toxine is iets sterker voor mense-erythrocyten dan voor konijne-erythrocyten (Wiseman, 1970).  $\delta$ -Toxine is thermostabiel en niet neutraliseerbaar met anti- $\alpha$ -toxine. De aanwezigheid van serum remt de lytische activiteit.

#### TOXINETITRATIES VAN CULTUURFILTRATEN.

Cultuurfiltraten van de moederstam V4, alle monomutanten en de stammen BT22( $\alpha$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) en BS36( $\delta$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) werden getitreerd tegen konijne- en mense-erythrocyten. Om de reproduceerbaarheid na te gaan, werd het experiment tweemaal uitgevoerd met verschillende cultuurfiltraten (A en B). In tabel 6 zijn de resultaten weergegeven in

Tabel 6. Hemolysepatroon op bloedagar en aantallen minimale hemolytische doses in twee cultuurfiltraten van moederstam en mutanten.

STAM	HEMOLYSE OP BLOEDAGAR MET ERYTHROCYTEN VAN:			M.H.D. IN DE CULTUURFIL- TRATEN A EN B GETITREERD TEGEN ERYTHROCYTEN VAN:			
	KONIJN	SCHAAP	MENS	KONIJN		MENS	
				A	B	A	B
V4	$\alpha, \delta$	$\alpha, \delta$	$\delta$	512	256	64	32
B1(Coag <sup>1</sup> )	$\alpha, \delta$	$\alpha, \delta$	$\delta$	512	256	64	64
B21( $\alpha$ Tox <sup>1</sup> )	$\delta$	$\delta$	$\delta$	64	64	32	16
BH5( $\alpha$ Tox <sup>1</sup> )	$\delta$	$\delta$	$\delta$	64	64	32	16
BT22( $\alpha$ Tox <sup>-</sup> , Leuc <sup>1</sup> )	$\delta$	$\delta$	$\delta$	8	4	16	4
BF34(Kin <sup>-</sup> )	$\alpha, \delta$	$\alpha, \delta$	$\delta$	512	n.o. <sup>+</sup>	64	n.o.
BS36( $\delta$ Tox <sup>-</sup> , Leuc <sup>1</sup> )	$\alpha$	$\alpha$	- <sup>x</sup>	128	64	32	16
L62(Leuc <sup>1</sup> )	$\alpha, \delta$	$\alpha, \delta$	$\delta$	512	256	64	32
CV4(-B,A,F)	$\alpha, \delta$	$\alpha, \delta$	$\delta$	512	256	64	32

+ n.o. = niet onderzocht

x geen hemolyse aantoonbaar

vergelijking met het hemolyse-patroon op agar, waaraan konijne-, schape- en mense-erythrocyten waren toegevoegd (methode volgens Elek). Hieruit blijkt dat voor de stammen B1(Coag<sup>1</sup>), BF34(Kin<sup>-</sup>), L62(Leuc<sup>1</sup>) en CV4(-B,A,F) geldt, dat het hemolysepatroon op bloedagar en het gevonden aantal minimale hemolytische doses (M.H.D.) in overeenstemming is met de waarnemingen die bij de moederstam werden gedaan. Deze stammen maken dus waarschijnlijk dezelfde hoeveelheid  $\alpha$ - en  $\delta$ -toxine als de moederstam. De cultuurfiltraten van de stammen die met de Elek-methode verlies voor  $\alpha$ - en  $\delta$ -toxine toonden, hadden een lagere lytische activiteit dan het cultuurfiltraat van de moederstam. Deze stammen werden nader onderzocht.

#### NEUTRALISATIE VAN CULTUURFILTRATEN DOOR ANTI- $\alpha$ -TOXINE EN INACTIVERING DOOR VERWARMING.

Om uit te maken in welke mate de verliesmutanten het vermogen om  $\alpha$ - en  $\delta$ -toxine te produceren, verloren hadden, werd van de twee cultuurfiltraten (A en B) vòòr en na neutralisatie door anti- $\alpha$ -toxine en vòòr en na verwarming het aantal M.H.D. bepaald. Bij een grove titratie was gebleken dat 1 tot 2 I.U. anti- $\alpha$ -toxine (Burroughs en Wellcome) 1 ml cultuurfiltraat van stam V4 nog geheel neutraliseerde. Alle cultuurfiltraten werden vervolgens geneutraliseerd met 6 I.U. anti- $\alpha$ -toxine per ml toxine. De methode was als volgt: 0,25 ml cultuurfiltraat werd gevoegd bij 0,25 ml anti- $\alpha$ -toxine. Na 30 minuten incubatie bij 37°C werd een verdunningsreeks gemaakt en 0,5 ml 2% konijne-erythrocyten toegevoegd, zoals bij de methoden onder toxinetitratie op pagina 14 is aangegeven. De cultuurfiltraten werden bovendien 30 minuten bij 60°C verhit en getitreerd. De uitkomsten voor de cultuurfiltraten A en B verschilden niet wezenlijk. Uit tabel 7, waarin de uitkomsten voor het cultuurfiltraat B zijn weergegeven, blijkt dat het cultuurfiltraat van stam V4 na neutralisatie of verwarming een resttiter overhoudt, die vermoedelijk door het thermostabiele  $\delta$ -toxine wordt veroorzaakt. De cultuurfiltraten van de stammen B21( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>) en BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>) zijn door anti- $\alpha$ -toxine te neutraliseren en door verwarming te inactiveren tot een lagere resttiter dan het cultuurfiltraat van stam V4. Aangezien er door neutrali-

Tabel 7. Aantal minimale hemolytische doses (M.H.D.) tegen konijne-erythrocyten van het cultuurfiltraat B vòòr en na neutralisatie met 6 I.U. anti- $\alpha$ -toxine per ml toxine en verwarming gedurende 30 minuten bij 60°C.

STAM	M.H.D. IN CULTUUR- FILTRATEN	M.H.D. IN CULTUURFILTRATEN NA:	
		VERWARMING	NEUTRALISATIE
V4	256	16	16
B21( $\alpha$ Tox <sup>-</sup> )	64	8	8
BH5( $\alpha$ Tox <sup>-</sup> )	64	8	8
BT22( $\alpha$ Tox <sup>-</sup> )	4	4	4
BS36( $\delta$ Tox <sup>-</sup> )	64	0	0

satie of verwarming lytische activiteit verloren gaat, is het waarschijnlijk dat deze stammen "leaky" mutanten zijn, ofschoon met de Elek-methode geen lytische activiteit van  $\alpha$ -toxine werd waargenomen. Stam BT22( $\alpha$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) lijkt geen werkzaam  $\alpha$ -toxine meer te produceren. Neutralisatie en verwarming geven geen verlaging van het aantal M.H.D. Het cultuurfiltraat van stam BS36( $\delta$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) heeft na neutralisatie of verwarming geen waarneembare lytische activiteit meer. De stam maakt dus alleen  $\alpha$ -toxine.

Wanneer de cultuurfiltraten na verwarming werden getitreerd met mense-erythrocyten bleek dat  $\alpha$ -toxine ook mense-erythrocyten lyseert. In tabel 8 zijn de resultaten van een dergelijk experiment met twee nieuwe cultuurfiltraten (C en D) van de stammen V4, BT22( $\alpha$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) en BS36( $\delta$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) en BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>) weergegeven. Slechts een gedeelte van het aantal M.H.D. tegen mense-erythrocyten kon bij het cultuurfiltraat van stam V4 worden geïnactiveerd, hetgeen wijst op  $\alpha$ - en  $\delta$ -toxine-activiteit. Het toxine van het cultuurfiltraat van stam BT22( $\alpha$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) was thermostabiel, hetgeen wijst op uitsluitend  $\delta$ -toxineactiviteit. De totale inactivering van het cultuurfiltraat van stam BS36( $\delta$ Tox<sup>-</sup>) komt overeen met uitsluitend  $\alpha$ -toxineactiviteit.

Tabel 8. Aantal minimale hemolytische doses (M.H.D.) tegen konijne- en mense-erythrocyten van twee cultuurfiltraten (C en D) voor en na inactivering door verwarming gedurende 30 minuten bij 60°C.

STAM	M.H.D. IN CULTUURFILTRATEN GETITREERD TEGEN KONIJNE- ERYTHROCYTEN				M.H.D. IN CULTUURFILTRATEN GETITREERD TEGEN MENSE- ERYTHROCYTEN			
	VOOR VERWARMING		NA VERWARMING		VOOR VERWARMING		NA VERWARMING	
	C	D	C	D	C	D	C	D
V4	128	256	8	16	32	32	4	4
BT22( $\alpha$ Tox <sup>-</sup> , Leuc <sup>1</sup> )	4	4	4	2	4	2	4	2
BS36( $\delta$ Tox <sup>-</sup> , Leuc <sup>1</sup> )	32	64	0	0	8	16	0	0
BH5( $\alpha$ Tox <sup>1</sup> )	n.o. <sup>x</sup>	64	n.o.	8	n.o.	16	n.o.	4
B21( $\alpha$ Tox <sup>1</sup> )	n.o.	64	n.o.	8	n.o.	16	n.o.	4

x n.o. = niet onderzocht

Tenslotte werd nog onderzocht of stam BS36( $\delta$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) dezelfde hoeveelheid  $\alpha$ -toxine produceerde als de moederstam. Hiertoe werd met twee cultuurfiltraten van stam V4 en BS36( $\delta$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) die onder gelijke omstandigheden werden gemaakt, het volgende experiment gedaan. Van anti- $\alpha$ -toxine 8E/ml werd een verdunningsreeks met stappen van 20% gemaakt. Aan 0,25 ml cultuurfiltraat van stam BS36 werd 0,25 ml van elke anti-toxine-verdunning toegevoegd. Na incubatie werd getitreerd. De minimale neutraliserende dosis bleek 1,28 I.U. per ml toxine te zijn. Wanneer het cultuurfiltraat van stam V4 met 1,28 I.U. per ml werd geneutraliseerd werd een resttiter verkregen die met een overmaat van 4 I.U. per ml niet lager werd.

#### CONCLUSIE.

In de cultuurfiltraten van stam BT22( $\alpha$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) is lytische activiteit ten gevolge van  $\alpha$ -toxine niet aantoonbaar. De stammen B21( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>) en BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>) tonen nog wel  $\alpha$ -toxine-activiteit en zijn dus "leaky"

mutanten. Stam BS36( $\delta$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) maakt waarschijnlijk evenveel  $\alpha$ -toxine als de moederstam terwijl het vermogen om  $\delta$ -toxine te vormen verloren lijkt te zijn gegaan.

#### BESPREKING.

De verkregen monomutanten voor verlies van coagulase,  $\alpha$ -toxine, stafylokinase en P-V leucocidine leken in aanmerking te komen om in het dierexperiment met de moederstam te worden vergeleken. Verlies van  $\delta$ -toxine ging altijd gepaard met een verminderde productie van leucocidine. Interpretatie van eventuele virulentie verschillen met de moederstam zal hierdoor bemoeilijkt worden.

Stam B1(Coag<sup>1</sup>) leek aanvankelijk geen vrij coagulase te produceren, aangezien de coagulase buisjertest na 24 uur negatief was. Tijdens het vergelijkend onderzoek in het dierexperiment werd de stam bij herhaling opnieuw onderzocht en hierbij bleek dat na 24 uur een klein stolsel werd gevormd. Bij stam V4 stolt de buisinhoud na 2 uur. De stam is vermoedelijk een "leaky" mutant.

Verliesmutanten voor  $\alpha$ - en  $\delta$ -toxine leken relatief gemakkelijk met EMS te induceren. De plaatmethode volgens Elek bleek echter ongevoelig, aangezien twee van de drie mutanten toch nog  $\alpha$ -toxine produceerden. De stammen B21( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>) en BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>) zijn dus leaky mutanten. Stam BT22( $\alpha$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) leek het vermogen om  $\alpha$ -toxine met lytische activiteit op konijne-erythrocyten te produceren geheel te hebben verloren. De mogelijkheid blijft bestaan dat er een structureel veranderd eiwit wordt gevormd. Helaas ging dit onvermogen  $\alpha$ -toxine te produceren gepaard met een verminderde leucocidineproductie.

Monomutanten voor de andere eigenschappen van S. aureus zoals DNase, tween-splitsend lipase, hyaluronidase en fosfatase werden niet gevonden. Het is mogelijk dat te weinig inductie-experimenten werden gedaan of dat te weinig kolonies werden onderzocht. Dit lijkt niet het geval te zijn voor het DNase, waar een groot aantal inductie-experimenten werden ver-

richt, maar monomutanten niet werden gevonden.

Verliesmutanten voor meer dan één eigenschap van S. aureus werden relatief vaker gevonden dan monomutanten. Er bleek een grote variabiliteit te bestaan waarin, afgezien van gecombineerd voorkomen van  $\delta$ -toxine verlies en een verminderde leucocidineproductie, geen systeem in te ontdekken was. Herhaaldelijk werden stammen gevonden die vrijwel alle voor S. aureus kenmerkende eigenschappen verloren hadden. Deze stammen vormden soms ook witte kolonies op bloedagar en waren altijd ongevoelig voor de 27 typerende fagen van het faagtyperingssysteem van S. aureus. Deze stammen, die wel hetzelfde resistentie-spectrum voor antibiotica als de moederstam hadden, zouden contaminanten kunnen zijn. Het is ook mogelijk dat ze gemuteerd zijn tot S. epidermidis. Stammen die meer dan één, maar niet alle eigenschappen van S. aureus hadden verloren, bleven pigment vormen en hadden hetzelfde faagpatroon als de moederstam. Bij deze stammen werd nogal eens waargenomen dat het verlies van bepaalde eigenschappen niet altijd reproduceerbaar was, wanneer ze vanuit gevriesdroogde vorm opnieuw werden onderzocht. Het is mogelijk dat deze stammen niet rein waren of dat er een reversie was opgetreden. Soms werd opgemerkt dat bepaalde eigenschappen weer in verzwakte mate terugkeerden. Het is niet onmogelijk dat deze multi-pele veranderingen uitdrukking zijn van een mutatie met pleiotroop karakter bijvoorbeeld een mutatie in een transportmechanisme of in de celwand.



### Hoofdstuk 3

## LYSOGENE CONVERSIE NAAR PRODUCTIE VAN STAFYLOKINASE EN LEUCOCIDINE

### I N L E I D I N G

Bacteriofagen zijn virussen die zich slechts binnen de bacterie kunnen vermenigvuldigen. De relatie tussen virus en gastheer is in hoge mate specifiek. Wegens deze specificiteit is het ondermeer voor S. aureus mogelijk gebleken een faagtyperingssysteem op te bouwen.

Een bacteriofaag bestaat uit een DNA-spiraál waaromheen zich een eiwit-mantel bevindt. Met behulp van specifieke antisera gericht tegen het faag-eiwit zijn de stafylofagen in een aantal groepen ingedeeld (Rountree, 1949). De meeste stafylofagen behoren tot de groepen A, B en F.

Virulente fagen veroorzaken na infectie altijd lysis van de gastheer. Het na adsorptie van faag in het cytoplasma geïnjecteerde DNA veroorzaakt een wijziging in de celstofwisseling. Er vindt replicatie van faag-DNA en synthese van faageiwit plaats. Na assemblage van faagonderdelen worden er nieuwe faagpartikels gevormd die bij lysis van de cel vrijkomen.

Gematigde fagen verschillen van virulente fagen omdat ze bovendien het vermogen bezitten te worden ingebouwd in het bacteriechromosoom. Faagvermeerdering en lysis van de gastheer vindt niet plaats, maar het faagdeeltje, nu profaag genaamd, gaat deel uitmaken van het bacteriegenoom. Bij replicatie van het bacteriechromosoom wordt het faag-DNA eveneens gerepliceerd. Door de aanwezigheid van een profaag wordt de bacterie immuun voor die faag. Het verschijnsel wordt lysogenie genoemd en men spreekt van een lysogene stam omdat de profaag los kan raken van het bacteriechromosoom waarna een vegetatieve cyclus kan beginnen. Dit laatste komt spontaan voor in lysogene bacterieculturen zodat daarin vrijwel altijd vrije faagpartikels worden aangetroffen. Het vrijkomen van faagpartikels kan worden bevorderd door de cultuur te bestralen met U.V. licht of bloot te stellen aan mutagene stoffen zoals waterstof-

peroxyde, stikstofmosterdgas en mitomycine C. Mitomycine C, een antibioticum met antitumor-activiteit, heeft een sterk faaginducerend vermogen bij E. coli (Otsuki e.a., 1959) en stafylokokken (Verhoef, 1970). Deze stof vormt covalente bindingen met DNA, waardoor DNA-synthese wordt geremd (Weissenbruch en Lisio, 1965). Een lysogene bacterie kan eveneens spontaan genezen van zijn profaag (Bertani, 1958). Hieronder wordt verstaan dat de profaag losraakt van het chromosoom en de cel verlaat zonder dat een lytische cyclus begint.

Stammen die een profaag dragen, verschillen van verwante stammen die deze profaag niet bezitten. Een stam wordt immuun voor de faag waarvoor hij lysogeen is. Deze blokkering van de faaggevoeligheid hoeft echter niet beperkt te blijven tot deze faag, maar kan zich uitstrekken tot verwante en niet verwante fagen. Het faagpatroon van S. aureus wordt bepaald door de basale genetische gevoeligheid waarin wijzigingen kunnen optreden door de aanwezigheid van profagen. Dit is ondermeer aangetoond voor de epidemiologisch belangrijke groep stafylokokken van het 52/52A/80/81 complex. De stafylokokken met de faagpatronen 80, 81, 80/81, 52/52A/80 en 52/52A/80/81 worden thans als verwant beschouwd. De verschillen kunnen worden verklaard door een verschil in lysogenie van deze stammen. Een vermoedelijk van alle profagen genezen vertegenwoordiger van deze stammen bezit een verdere uitbreiding van de faaggevoeligheid voor fagen van groep I en III. Dit faagpatroon wordt als het basale faagpatroon van deze groep stafylokokken beschouwd (Asheshov en Winkler, 1966).

Behalve een wijziging in faaggevoeligheid kan de aanwezigheid van een profaag een nieuwe eigenschap aan een bacterie toevoegen of juist een aanwezige eigenschap onderdrukken. Dit verschijnsel wordt lysogene conversie genoemd, wanneer de verandering van het genotype gebonden is aan de aanwezigheid van een profaag. Aan elke gelysogeniseerde bacterie wordt het kenmerk toegevoegd, dat weer verloren gaat zodra de profaag niet meer aanwezig is. Lysogene conversie moet worden onderscheiden van transductie, waarbij genetisch materiaal van een bacterie naar een andere wordt overgebracht door een transducerende faag.

Lysogene conversie is bij een groot aantal bacteriesoorten aangetoond. Bij voor de mens pathogene bacteriën kan lysogene conversie invloed uitoefenen op de virulentie. Freeman toonde in 1951 aan dat de vorming van dif-

terietoxine onder invloed staat van een profaag. Ook bij de vorming van het erytrogene toxine door streptokokken van groep A bleek de aanwezigheid van een profaag een rol te spelen (Zabriski, 1964). Winkler en medewerkers beschreven in 1965 bij S. aureus een gekoppelde lysogene conversie naar productie van stafylokinase en verlies van  $\beta$ -toxine door fagen uit groep F. Rosendal en Bülow (1965) beschreven een lysogene conversie naar verlies van een twee 80-splitsend lipase bij stafylokokken van het 52/52A/80/81 complex. Zij vonden een positieve correlatie tussen de virulentie van ziekenhuisstammen en het onvermogen twee 80 te kunnen splitsen (Jessen e.a., 1969). Het lijkt dus noodzakelijk de invloed van fagen bij het virulentieonderzoek van pathogene bacteriën te betrekken.

Als uitgangspunt van de in dit hoofdstuk beschreven onderzoeken is de vraagstelling genomen of de gevonden mutanten van de stam V4 chromosomale mutanten zijn of dat de verandering in eigenschappen veroorzaakt kan zijn door verlies van profaag.

## M A T E R I A A L   E N   M E T H O D E N

### STAMMEN EN BACTERIOFAGEN.

Stam V4 en de van deze stam afgeleide mutanten zijn beschreven in hoofdstuk 2. Stam S57 werd als universele indicatorstam gebruikt, omdat zij vermoedelijk vrij van lysogene fagen is. De stam is gevoelig voor alle fagen van groep I en III van het internationale faagtyperingssysteem (Winkler e.a., 1965). Fagen en bijbehorende propagerende stafylokokken werden verkregen van het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid (R.I.V.) te Utrecht (zie onder faagtypering). De fagen werden in de bouillon waarin ze waren gepropageerd, bewaard bij 4°C. Bacteriestammen werden gevriesdroogd.

### MEDIA.

Voor alle faagexperimenten werden Nutrient Broth No. 2 (Oxoid) en Nutrient Agar (Oxoid) gebruikt. Voor faagtitraties en voor propagering van fagen werd hieraan  $\text{CaCl}_2$  toegevoegd in een concentratie van 400  $\mu\text{g/ml}$ . De methoden en specifieke media voor het testen van eigenschappen van S. aureus zijn beschreven in hoofdstuk 2.

#### FAAGTITRATIES.

Met pasteurpipetten gestandaardiseerd op een druppelvolumen van 0,025 ml werd van de fagen op een plastic gaatjestableau een verdunningsreeks in bouillon gemaakt van 1/10, 1/100, 1/200, 1/500, 1/1000 enz. Droge agar-platen werden bevoeid met een 6 uren schudcultuur van de indicatorstam. De resterende bacteriesuspensie werd met een pipet verwijderd. Na drogen van de plaat werd een standaarddruppel van elke faagverdunding op het bacteriedek gebracht. De platen werden 18 uur bij 30°C bebroed en afgelezen. De reacties werden genoteerd als confluentes lysis, semiconfluentes lysis, meer dan 100 plaques en minder dan 100 plaques. De faagsterkte werd aangegeven in aantallen R.T.D. (routine test dilution) of in aantallen plaquevormende eenheden per ml (P.V.E./ml). Onder een R.T.D. werd die verdunding verstaan die net niet meer complete lysis geeft. Plaquetelling werd onder een plaatmicroscoop verricht in die faagverdunding die ongeveer 50 plaques had veroorzaakt.

#### FAAGTYPERING.

Faagtypering werd volgens de methoden van Blair en Williams (1961) door het R.I.V. te Utrecht (Dr. R.T.H. Scholtens en Dr. J. Borst) verricht. De gebruikte fagen waren de 21 fagen van de standaardset, aangevuld met de fagen Nobel (N), 83, 83A, 84, 44B en 85.

#### INDUCTIE VAN FAAG DOOR MITOMYCINE C (MC.).

Aan 8 ml bouillon werd 1 ml van een verdunde MC. (Sigma) oplossing toegevoegd en beënt met 1 ml van een 16 uren cultuur. Bij standaardinductieproeven bedroeg de uiteindelijke MC.-concentratie 0,5 µg/ml. Na incubatie gedurende 6 uur bij 37°C werden de bacteriën gecentrifugeerd en de bovenstaande vloeistof gefiltreerd door een Millipore membraanfilter van 0,20 µm. De aanwezigheid van faag werd aangetoond door een faagtiteratie te verrichten op de universele indicatorstam S57.

#### HET PROPAGEREN VAN FAGEN.

Een duidelijk geïsoleerde plaque werd met een entoog aangetipt en gepropageerd op een dek van S57. Na 18 uur bebroeden bij 30°C werd ongeveer 0,5 ml bouillon op de lytische zone gedruppeld, waarin de faag met een spatel werd gesuspenderd. De suspensie werd vervolgens met een pasteurpipet overgebracht in 50 ml bouillon, die beënt werd met 2,5 ml 16 uren cultuur van S57. Bebroeding vond plaats in een schudwaterbad bij 30 of 37°C gedurende

6 uur. Na centrifugering van de bacteriën en filtratie van de bovenstaande vloeistof door een Millipore membraanfilter van  $0,20\ \mu\text{m}$  werd de sterkte bepaald door middel van een faagtitratie. Voor het propageren van faagmengsels met reeds bekende sterkte werd 50 ml bouillon beënt met  $10^7$  bacteriën per ml en  $10^5$  faagpartikels per ml.

#### SEROLOGISCHE GROEPSBEPALINGEN VAN FAGEN.

Antisera gericht tegen fagen van groep A, B en F werden verkregen van Mrs. E.H. Asheshov (Central Public Health Laboratory, Colindale, London). De sera werden in verdunningen van 1/10 bij  $-20^{\circ}\text{C}$  bewaard. Principe en uitvoering van de faaginactiveringsreactie zijn aangegeven door Burnet (1937). De methode werd als volgt gewijzigd. Van het te onderzoeken faagmengsel, verdund tot R.T.D.x 10, werden 6 standaarddruppels gevoegd bij drie druppels 1/10 verdund antiserum en bij drie druppels bouillon in het controle-experiment. Na incubatie gedurende 1 uur bij  $37^{\circ}\text{C}$  werden de buisjes in ijswater gekoeld. In een plastic gaatjestableau werd van het mengsel een verdunningsreeks van 1/10, 1/100, 1/200, 1/500, 1/1000, 1/5000 gemaakt. Het onverdunde mengsel en de verdunningen werden getitreerd op een dek van S57. Na 18 uur bebroeden bij  $30^{\circ}\text{C}$  werden de faagreacties afgelezen en indien mogelijk werden plaquetellingen verricht in de verdunningen die minder dan 100 plaques toonden. Slechts verschillen ten opzichte van de controle van 30% of meer werden als zekere inactivering beschouwd. De bepaling werd minstens tweemaal verricht om te zien of de uitkomsten reproduceerbaar waren.

#### BEREIDING VAN ANTIFAAGSERA.

Twee ongeveer 3 maanden oude konijnen (witte Nieuw-Zeelanders) werden dagelijks gedurende 1 week met 1 ml  $10^{10}$  P.V.E./ml i.v. ingespoten. De konijnen kregen twee boosterinjecties respectievelijk 1 en 2 weken na de laatste injectie. Het serum werd vijf dagen na de tweede boosterdosis getest. De titer van het inactiverende vermogen werd opgegeven als de reciproque waarde van de hoogste verdunning die nog meer dan 90% plaquereductie gaf.

#### HET GENEZEN VAN EEN S. AUREUS VAN ZIJN LYSOGENE FAGEN.

Een voorcultuur van de stam V4 in 4 ml bouillon waaraan 1 ml antifaagserum was toegevoegd werd na 18 uur bebroeden bij  $37^{\circ}\text{C}$  gecentrifugeerd, driemaal gewassen met fysiologisch zout en met bouillon aangevuld tot het oorspronkelijke volume. Aan 2 ml van deze cultuur werd 2 ml antifaagserum en 1 ml

van een tot de gewenste concentratie verdunde MC.-oplossing toegevoegd. Het mengsel werd 30 of 60 minuten geïncubeerd bij 37°C en vervolgens in stappen van 1/10 verdund tot 10<sup>-6</sup>. Minstens 5 platen werden beënt met 4 druppels uit elke verdunning, die met een spatel werden gespreid. Na 18 uur bebroeden bij 37°C werden losliggende kolonies getest op hun faaggevoeligheid voor de eigen door MC.-inductie verkregen faag. De kolonies werden met een entoog aangetipt en streepvormig overgeënt op een agarplaat en wel loodrecht op een tevoren aangebrachte entstreep van faag met een sterkte van R.T.D.x 100. Na 18 uur bebroeden bij 30°C werden de platen onderzocht op lytische reacties op de kruispunten.

#### LYSOGENISATIE VAN S. AUREUS STAMMEN.

Twee methoden werden gebruikt. De eerste methode bestond uit het aantippen van de secundaire groei in het door faag gelyseerde gebied van de te lysogeniseren stam. Hiertoe werden enkele standaarddruppels van faag met een sterkte van R.T.D.x 100 op een bacteriedek gedruppeld zoals bij de faagtiteratie is aangegeven. Na 24 uur bebroeden bij 30°C werden kolonies die in het door faag gelyseerde gebied werden waargenomen enkele malen overgeënt om de contaminerende faagpartikels kwijt te raken en getest op faaggevoeligheid voor de faag waarmee werd gelyso-geniseerd. De andere methode bestond uit beënting van 2 buisjes van 5 ml bouillon met CaCl<sub>2</sub> met elk twee standaarddruppeld van een 16 uren cultuur. Vervolgens werden aan één buis zoveel faagpartikels toegevoegd dat de faag-bacterieverhouding 10:1 was. Bebroeding vond plaats bij 30°C gedurende 16 uur. Bij een geslaagd lysogenisatie-experiment werd gezien dat in de faagbevattende buis, in vergelijking met de controle-cultuur zonder faag de eerste 6 uur geen of slechts geringe groei optrad. Na 18 uur bebroeden werd de cultuur bij voldoende troebeling verdund en geënt op een bloedplaat. Enkele kolonies werden vervolgens, zoals bij de eerste methode, getest op hun faaggevoeligheid en enkele malen overgeënt.

## R E S U L T A T E N

### A. INLEIDEND ONDERZOEK NAAR VERSCHILLEN IN LYSOGENIE VAN DE MOEDERSTAM V4 EN DE MUTANTEN.

Verlies van profagen gaat vaak gepaard met veranderingen in het faaggevoeligheidspatroon. Een identiek faaggevoeligheidspatroon maakt het onwaarschijnlijk dat de verandering in eigenschappen bij mutanten veroorzaakt wordt door lysogene conversie. Alle mutanten en de moederstam V4 werden daarom tegelijk gefaagtypeerd.

Een andere benadering was om bij de V4 en de mutanten met MC. faag te induceren en het plaquetype onderling te vergelijken.

Als derde methode om verschillen in lysogenie van de stammen na te gaan werd gebruik gemaakt van het verschijnsel dat een bacteriestam ongevoelig is voor de faag waarvoor hij lysogeen is en omgekeerd, dat een stam die genezen is van een profaag gevoelig wordt voor deze faag. De faaggevoeligheid van een aantal mutanten voor geïnduceerde faaglysaten van de V4 werd daarom onderzocht.

### HET FAAGPATROON VAN DE MOEDERSTAM V4 EN DE MUTANTEN.

De stam V4 liet bij faagtypering in de R.T.D. slechts een sterke reactie van faag 29 zien. Bij typering in de R.T.D.x 100 werden soms multiple zwakke (15-50 plaques) en zeer zwakke (minder dan 15 plaques) reacties gevonden. Het faagpatroon werd vastgesteld op 29.

Alle mutanten die in dit proefschrift zijn opgenomen werden gefaagtypeerd. De mutanten die, getypeerd in de R.T.D., slechts gevoelig waren voor faag 29 werden als identiek beschouwd. In vergelijking met de moederstam V4 toonden deze mutanten in de R.T.D.x 100 soms geringe verschillen in reactiesterkte voor dezelfde fagen of gevoeligheidsverschillen in zwakke of zeer zwakke reacties, die volgens algemeen aanvaarde criteria (Asheshov, 1967) niet tot verwerping van identiteit hoeven te leiden.

Er werden twee groepen mutanten gevonden die van de V4 verschilden. De eerste groep bestond uit mutanten die alle of vrijwel alle kenmerkende eigenschappen van S. aureus hadden verloren. Deze stammen, die op een bloed-

agarplaat het aspect van S. epidermidis hadden, waren niet typeerbaar. Zij waren wel novobiocine-resistent, hetgeen een contaminatie met S. epidermidis tijdens het mutatie-experiment minder waarschijnlijk maakt. Het lijkt aannemelijk dat de basale genetische gevoeligheid voor faag door de mutatie is gewijzigd, mogelijk door verandering in de celwand.

De tweede groep mutanten toonde bij herhaling verschillen in de R.T.D. en R.T.D.x 100. De twee verliesmutanten voor stafylokinase BF34(Kin<sup>-</sup>) en BE5(Kin<sup>-</sup>) toonden een zwakke reactie voor faag 81 in de R.T.D. en sterke reacties voor faag 81 en 42E in de R.T.D.x 100. Het faagpatroon was 29/+. De verliesmutant voor leucocidineproductie L62(Leuc<sup>1</sup>) toonde een zwakke reactie voor faag N in de R.T.D. en eveneens multiple verschillen in de R.T.D.x 100. Het faagpatroon was 29/+. In tabel 7 op pagina 61 zijn de faagreacties volledig weergegeven.

#### HET INDUCEREN VAN FAAG BIJ DE MOEDERSTAM EN DE MUTANTEN.

De moederstam V4 werd in totaal 8 maal geïnduceerd met MC. in een concentratie van 0,5 µg/ml. De mutanten B1(Coag<sup>-</sup>), BS36(αTox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>), BH5(αTox<sup>1</sup>), B21(αTox<sup>1</sup>), BT22(αTox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>), BE5(Kin<sup>-</sup>), BF34(Kin<sup>-</sup>) en L62(Leuc<sup>1</sup>) werden éénmaal geïnduceerd. Na titratie op S57 werden wisselende faagsterkten van R.T.D.x 500-5000 gevonden. Twee controle-experimenten bij de stam V4 zonder MC. gaven lage titers van minder dan de R.T.D.

Bij het aflezen van de faagtitraties werden twee verschillende plaque-types gezien. Stam V4 en alle mutanten toonden grote en kleine plaques. Dit werd als een aanwijzing beschouwd voor de aanwezigheid van meer dan één faagsoort in de lysaten.

#### HET TESTEN VAN DE GEVOELIGHEID VAN DE MOEDERSTAM EN DE MUTANTEN VOOR BIJ DE MOEDERSTAM GEÏNDUCEERDE FAAGMENGSELS.

Zoals kon worden verwacht was de moederstam V4 ongevoelig voor het bij deze stam geïnduceerde faaglysaat. Alleen de mutanten BF34(Kin<sup>-</sup>), BE5(Kin<sup>-</sup>) en L62(Leuc<sup>1</sup>) toonden faagreacties.



## CONCLUSIE

Aangezien de geïnduceerde fagen van de V4 tot verschillende plaquetypen aanleiding geven, is het waarschijnlijk dat de moederstam V4 meer dan één profaag bevat. Alle lysaten van de mutanten toonden eveneens grote en kleine plaques zodat over verlies van profaag geen conclusies waren te trekken.

Op grond van het verschil in faagpatroon met de V4 en de gebleken gevoeligheid voor geïnduceerde faaglysaten van de V4, kan worden geconcludeerd dat de mutanten BF34(Kin<sup>-</sup>) en BE5(Kin<sup>-</sup>) waarschijnlijk dezelfde profaag verloren hebben en dat de mutant L62(Leuc<sup>1</sup>) genezen lijkt van een andere profaag. Bij deze drie mutanten moet rekening worden gehouden met het verschijnsel van lysogene conversie.

Lysogene conversie lijkt niet in het spel te zijn bij de andere mutanten, waaronder de verliesmutanten voor  $\alpha$ -toxine, coagulase en  $\delta$ -toxine. Ze kunnen waarschijnlijk worden beschouwd als "echte" mutanten, waarmee wordt bedoeld dat het genoom is gemodificeerd zonder invloed van fagen.

## B. SEROLOGISCH ONDERZOEK VAN DE GEÏNDUCEERDE FAGEN VAN DE MOEDERSTAM.

De moederstam V4 bevat waarschijnlijk meer dan één profaag. Met antisera gericht tegen A-, B- en F-fagen werd nagegaan of het mogelijk zou zijn een indruk te krijgen van het aantal fagen dat in stam V4 aanwezig is.

## HET TESTEN VAN DE SPECIFICITEIT VAN DE ANTIFAAGSERA.

Drie antisera, gericht tegen A-, B- en F-fagen, (A-, B- en F-sera) werden op specificiteit getest door het uitvoeren van een inactiveringsreactie met fagen van het internationale faagtyperingssysteem, waarvan de serologische groepering bekend is (Blair en Williams, 1961). In tabel I zijn de resultaten weergegeven. Hieruit blijkt dat het B-serum specifiek is. Het F-serum toont een sterke kruisreactie met A-fagen, zoals ook door Mrs. E.H. Asheshov, die de sera bereidwillig ter beschikking stelde, was opgegeven. Helaas bleek ook het A-serum zwakke inactiveringsreacties te

Tabel 1. De inactiveringsreacties van de antisera A, B, F en de eigen antisera E1 en E2 met fagen van het faagtype-ringssysteem. De inactivering op S57 als indicatorstam is uitgedrukt in percentages van de controle.

FAGEN	SEROL.	INACTIVERINGS % DOOR DE ANTISERA				
	GROEP	A	B	F	E1	E2
47	A	100	0	100	83	100
42E	A	100	0	100	65	-
53	B	92	100	0	100	0
52A	B	85	100	0	-	0
77	F	0	0	100	0	0

geven met B-fagen. In de tabel zijn eveneens de antisera E1 en E2 opgenomen waarvoor verwezen wordt naar pagina 54 en 55.

#### SEROLOGISCHE GROEPSBEPALING VAN EEN AANTAL DOOR INDUCTIE VAN DE MOEDERSTAM VERKREGEN FAAGLYSATEN.

Vier door inductie met MC. verkregen faaglysaten van V4 werden serologisch getypeerd. Het faaglysaat V4 I werd verkregen door één plaque van het grote plaquetype te propageren op een dek van S57. De faaglysaten V4 II, V4 III en V4 IV werden na inductie niet gepropageerd. De serologische typering van deze faaglysaten gaf onderling wisselende maar reproduceerbare uitkomsten. De resultaten van de inactiveringsreacties op S57 als indicatorstam als mede het plaquetype op de controleplaat zijn weergegeven in tabel 2. Het faaglysaat V4 I, dat op S57 alleen grote plaques liet zien, werd volledig geïnactiveerd door het specifieke B-serum, terwijl het met B-fagen kruisreagerend A-serum een zwakke inactivering gaf. F-fagen leken niet aanwezig althans niet in de verdunning van R.T.D.x 10 waarin het experiment werd uitgevoerd. De drie andere faaglysaten V4 II, III en IV, die op S57 een gemengd plaquetype van grote en kleinere plaques gaven, werden in wisselende mate door de drie sera geïnactiveerd. De grote plaques waren afwezig op de platen waarop de inactivering door

Tabel 2. Plaquetype en inactivering van vier verschillende faaglysaten van V4 door de antisera A, B en F op S57 als indicatorstam. Het plaquetype werd bepaald in het controle-experiment zonder antiserum.

FAAG- LYSATEN		PLAQUETYPE OP S57	INACTIVERINGS % DOOR DE ANTISERA		
			A	B	F
V4	I	alleen grote plaques	53	100	0
V4	II	gemengd <sup>x</sup>	68	0	91
V4	III	gemengd	0	53	100
V4	IV	gemengd	0	30	80

x grote en kleine plaques

het B-serum werd bepaald. De plaques, voor zover aanwezig op de platen waarop de A- en F-inactivering werd bepaald, waren altijd gemengd. Hieruit kan worden geconcludeerd dat de grote plaques door B-fagen worden gevormd. De wisselende inactivering van de vier faaglysaten van V4 kan worden verklaard door aan te nemen dat bij MC.-inductie van dezelfde stam niet altijd dezelfde profagen vrijkomen of dat hun onderlinge verhouding in het mengsel verschilt. Dit laatste leek met name het geval bij faaglysaat V4 II. In tabel 3 zijn de inactiveringsreacties volledig weergegeven. Op grond van het aantal plaques was inactivering door het B-serum niet aantoonbaar, terwijl toch de grote plaques, aanwezig op de controle-platen, waren verdwenen. Het niet kunnen waarnemen van de inactivering door het B-serum kan worden verklaard door aan te nemen dat er in dit mengsel slechts weinig profagen van groep B aanwezig waren. Kleine plaques, versluierd door de grote plaques op de controle-platen, werden weer meegeteld op de platen waarop de inactivering door het B-serum plaats vond; hierdoor werd, vergeleken met de controle, hetzelfde aantal gevonden. De gevonden inactivering door het A-serum is een aanwijzing voor de aanwezigheid van A-fagen.

Tenslotte werd geprobeerd een aantal losliggende grote en kleine plaques aan te prikken, te propageren op S57 en serologisch te typeren. Hiermee

Tabel 3. De inactivering van faaglysaat V4 II door het A-, B- en F-serum en het waargenomen plaquetype. De inactiveringspercentages zijn berekend in de verdunning 1/500. Het plaquetype werd bepaald in het controle-experiment.

FAAG GEINCUB. MET	AANTALLEN PLAQUES NA INCUBATIE IN DE VERDUNNINGEN							%	PLAQUE TYPE
	0	1/10	1/100	1/200	1/500	1/1000	1/5000		
bouillon	CL	SCL	100	100	53	20	5	-	gemengd
A-serum	CL	SCL	100	40	17	8	1	68	gemengd
B-serum	CL	SCL	100	100	51	22	3	0	klein
F-serum	CL	SCL	31	11	5	2	1	91	groot

Symbolen: CL = confluenta lysis

SCL = semiconfluenta lysis

100 = meer dan 100 plaques

werden fagen verkregen die op S57 uitsluitend uit grote of kleine plaques bestonden. De uit grote plaques bestaande fagen werden voor 100% geïnactiveerd door het B-serum en zwak geïnactiveerd door het met B-fagen kruisreagerende A-serum. Ze bestonden dus uit B-fagen. Een bijmenging met A-fagen was niet uit te sluiten. De uit kleine plaques bestaande fagen werden allen uitsluitend en voor 100% geïnactiveerd door het F-serum. Deze fagen waren dus F-fagen. Zuivere A-fagen die zowel door het A- als het F-serum moesten worden geïnactiveerd, werden niet verkregen.

#### CONCLUSIE.

Uit deze experimenten kan worden geconcludeerd dat het B-serum specifiek is. Het A-serum geeft zwakke kruisreacties met B-fagen. Het F-serum geeft sterke kruisreacties met A-fagen.

De moederstam V4 bevat meer dan één profaag. In de met MC. geïnduceerde faaglysaten worden B-fagen gevonden met een groot plaquetype. De faaglysaten bevatten in ieder geval ook F-fagen van het kleine plaquetype. De

aanwezigheid van A-fagen werd waarschijnlijk gemaakt in het faaglysaat V4 II, dat zo weinig B-fagen bevatte dat remming door het B-serum niet kon worden waargenomen. Bij herhaling werd echter wel inactivering aangetoond door het met B-fagen zwak kruisreagerende A-serum, zodat de aanwezigheid van A-fagen waarschijnlijk lijkt.

#### C. HET GENEZEN VAN DE MOEDERSTAM V4 VAN ZIJN LYSOGENE FAGEN.

Om uit te maken of er bij de mutanten BF34(Kin<sup>-</sup>), BE5(Kin<sup>-</sup>) en L62(Leuc<sup>1</sup>) een verband zou bestaan tussen de verandering van het fenotype en het vermoedelijke verlies van profaag, werd een poging ondernomen om de moederstam V4 stapsgewijs van zijn lysogene fagen te genezen.

MC.-inductie van V4 in een antifaagserum werd als methode gekozen. Het antiserum werd toegevoegd om te voorkomen dat een van een profaag genezen bacterie, die immers gevoelig is geworden voor deze faag, direct zou worden gelyseerd door in het mengsel aanwezige fagen, die door inductie van andere bacteriën vrijkomen.

Aangezien de fagen van het grote plaquetype, die tot groep B behoren, nog aanwezig waren in de verliesmutanten voor stafylokinase en leucocidine, werd eerst getracht V4 te genezen van profagen van groep B.

#### HET GENEZEN VAN STAM V4 VAN DE PROFAGEN VAN GROEP B.

Het antiserum werd gemaakt door twee konijnen te immuniseren met een faagmengsel, dat verkregen was door inductie van V4 en propagering in bouillon op S57, tot een sterkte van R.T.D.x 100.000. De eigenschappen van dit faagmengsel V4 I zijn besproken op pagina 51. Het bestond uit B-fagen en vormde uitsluitend grote plaques. De titers van de sera waren 10.000 en 1000. Het serum E1 (titer 10.000) werd onderzocht op specificiteit. Uit tabel 1 op pagina 51 blijkt dat het serum B-fagen volledig inactieveert, maar zwak kruisreageert met A-fagen.

Het genezingsexperiment werd uitgevoerd in bouillon met een MC.-concentratie van 0,5 µg/ml waaraan het antiserum E1 was toegevoegd. Na 30 minuten incubatie werden losliggende kolonies met de streepjesmethode ge-

test op faaggevoeligheid voor het faag V4 I lysaat. Onder de groep 800 - 1000 geteste kolonies werd één faaggevoelige kolonie aangetroffen. Deze stam CV4(-B) bleek, als de V4, novobiocine-resistent te zijn en werd vervolgens met MC. geïnduceerd, waarbij opnieuw faag, ditmaal uitsluitend van het kleine plaquetype, werd gevonden.

#### DE GENEZING VAN STAM CV4(-B) VAN PROFAGEN VAN GROEP A.

Een plaque van een met MC. geïnduceerd faaglysaat van stam CV4(-B) met een sterkte van R.T.D.x 10 werd aangetipt en gepropageerd op een dek van S57, waarmee een sterkte van R.T.D.x 5000 werd verkregen. De sterkte werd opgevoerd tot R.T.D.x 500.000 door propagering in bouillon. Slechts één konijn werd geïmmuniseerd. Het verkregen antiserum had een titer van 10.000. Uit tabel 1 op pagina 51 blijkt dat serum E2 een specifieke anti-A-faagactiviteit heeft.

Het faaglysaat CV4(-B) werd serologisch getypeerd. In tabel 4 is te zien dat het faaglysaat voor 100% wordt geïnactiveerd door het A-, F- en

Tabel 4. De inactivering van het faaglysaat CV4(-B) door het A-, B-, F- en E2-serum. De inactiveringspercentages zijn berekend in de verdunning 1/500.

FAAG GEINCUB. MET	AANTALLEN PLAQUES NA INCUBATIE IN DE VERDUNNINGEN							% INACTI- VERING
	0	1/10	1/100	1/200	1/500	1/1000	1/5000	
bouillon	CL	SCL	100	100	59	18	5	-
A-serum	0	0	0	0	0	0	0	100
B-serum	CL	SCL	100	100	53	21	4	0
F-serum	0	0	0	0	0	0	0	100
E2-serum	0	0	0	0	0	0	0	100

Symbolen: CL = confluenta lysis  
SCL = semiconfluenta lysis  
100 = meer dan 100 plaques

E2-serum. Het lysaat bestaat dus in ieder geval uit A-fagen, aangezien het A-serum niet kruisreageert met F-fagen. Tevens blijkt dat alle fagen door het specifiek anti-A werkzame E2-serum volledig worden geïnactiveerd.

De eerste poging tot genezing van CV4(-B) van de aanwezige profaag of profagen werd gedaan door de stam 30 minuten te incuberen in bouillon waaraan E2-serum en MC. (0,5  $\mu$ g/ml) waren toegevoegd. In totaal werden 1734 kolonies met de streepjesmethode getest op faaggevoeligheid voor het faag CV4(-B) lysaat. Faaggevoelige stammen werden niet gevonden. Vervolgens werd een tweede genezingspoging gedaan met MC.-concentraties van 1,0 en 2,5  $\mu$ g/ml en incubatietijden van 30 en 60 minuten. Per experiment werden 300 kolonies dus in totaal 1200 kolonies getest. Onder de kolonies die gedurende 1 uur in 1  $\mu$ g MC./ml waren geïncubeerd werd één faaggevoelige kolonie aangetroffen. Deze stam was, als V4, novobiocine-resistent. Na MC.-inductie van deze stam CV4(-B,A) werd opnieuw faag van het kleine plaquetype gevonden.

#### DE GENEZING VAN STAM CV4(-B,A) VAN PROFAGEN VAN GROEP F.

Na inductie van CV4(-B,A) met MC. werd een faaglysaat verkregen van R.T.D.x 500, dat op dezelfde wijze als het CV4(-B) lysaat werd gepropageerd op S57 tot een sterkte van R.T.D.x 100.000. De faag werd serologisch getypeerd. Uit tabel 5 blijkt dat dit faaglysaat uit F-fagen bestaat. A-fagen blijken niet meer aanwezig te zijn. Een eigen antifaag-serum werd niet gemaakt omdat voldoende F-serum in voorraad was.

Het genezingsexperiment werd uitgevoerd in een MC.-concentratie van 1  $\mu$ g/ml, waaraan het reeds 1/10 verdunde F-serum werd toegevoegd. De incubatietijd was 30 minuten. Van de 600 op faaggevoeligheid voor het CV4(-B,A) lysaat geteste kolonies bleken er twee gevoelig te zijn. Beide stammen waren novobiocine-resistent. Één van deze stammen CV4(-B,A,F) werd driemaal met MC. geïnduceerd. De filtraten werden getitreerd op S57 en alle 27 propagerende stammen van het faagtyperingssysteem. Faagreacties werden niet waargenomen.

Tabel 5. De inactivering van het faaglysaat CV4(-B,A) door het A-, B- en F-serum.

FAAG GEINCUB. MET	AANTALLEN PLAQUES NA INCUBATIE IN DE VERDUNNINGEN							% INACTI- VERING
	0	1/10	1/100	1/200	1/500	1/1000	1/5000	
bouillon	CL	CL	SCL	100	100	70	16	-
A-serum	CL	CL	SCL	100	100	83	12	0
B-serum	CL	CL	SCL	100	100	75	15	0
F-serum	0	0	0	0	0	0	0	100

Symbolen: CL = confluyente lysis  
SCL = semiconfluyente lysis  
100 = meer dan 100 plaques

#### LYSOGENISATIE VAN DE GENEZEN STAMMEN MET ZUIVERE B-, A- EN F-FAGEN EN HUN GEVOELIGHEID VOOR DEZE FAGEN.

De lysogenisatie-experimenten werden uitgevoerd met faaglysaten waarvan werd verondersteld dat ze uitsluitend uit B-, A- en F-fagen bestonden.

De B-faag, afkomstig van het faag V4 I lyfaat, werd als zuiver beschouwd op grond van het uniforme plaquetype (uitsluitend grote plaques) en de 100% inactivering door het specifieke B-serum (zie tabel 2 op pagina 52).

Voor de F-faag werd het CV4(-B,A) lyfaat genomen dat werd gepropageerd op S57 en waarvan was aangetoond dat het alleen F-fagen bevatte (zie tabel 5).

De A-faag, geïnduceerd bij CV4(-B), die nog lysogeen is voor de A- en de F-faag, zou op theoretische gronden ook nog F-fagen kunnen bevatten



(zie tabel 4 op pagina 55). Door de A-faag selectief te propageren op een stam die alleen gevoelig is voor de A- en niet voor de F-faag, zou men de eventueel aanwezige F-fagen kunnen kwijtraken. Zoals op pagina 60 uiteen zal worden gezet, is de mutant L62(Leuc<sup>1</sup>) alleen genezen voor de A-faag. Het CV4(-B) lysaat werd daarom op stam L62(Leuc<sup>1</sup>) getitreerd. Vervolgens werd van de hoogste verdunning van het CV4(-B) lysaat die nog enkele plaques toonde één plaque aangetipt, gesuspendeerd in enkele druppels bouillon en opnieuw getitreerd op L62(Leuc<sup>1</sup>). Steeds uitgaande van een duidelijk geïsoleerde plaque werd dit nog tweemaal herhaald. Aangezien stam L62(Leuc<sup>1</sup>) nog lysogeen is voor B- en F-fagen werd ter vermindering van een nieuwe contaminatie hetzelfde nog tweemaal herhaald maar nu op de faagvrije S57 als indicatorstam. De derde maal werd één plaque gepropageerd op een dek van S57. Het nu verkregen faaglysaat dat weer voor 100% werd geïnactiveerd door zowel het A- als het met A-fagen kruisreagerende F-serum, werd als zuiver beschouwd.

Met de B-faag werd alleen stam CV4(-B) gelysogeniseerd. Stam CV4(-B,A) werd gelysogeniseerd met de A-faag en stam CV4(-B,A,F) met de A- en de F-faag. Stam BF34(Kin<sup>-</sup>)<sup>x</sup> was alleen gevoelig voor de F-faag en stam L62(Leuc<sup>1</sup>) alleen voor de A-faag. Deze stammen werden met respectievelijk de F- en de A-faag gelysogeniseerd. Stam S57, gevoelig voor al de drie fagen, werd alleen gelysogeniseerd met de A- en de F-faag.

Als controle-experiment werden nu alle stammen getest op hun faaggevoeligheid voor respectievelijk de B-, A- en F-faag. Uit tabel 6, waarin de gevoeligheid voor de B-, A- en F-faag is weergegeven, blijkt dat alle stammen, waarvan werd verondersteld dat ze lysogeen waren voor een bepaalde faag, ongevoelig waren voor die faag. De van faag genezen stammen bleken gevoelig te zijn geworden voor die faag.

x Stam BE5(Kin<sup>-</sup>) toonde in al de nu volgende experimenten geen verschillen met stam BF34(Kin<sup>-</sup>). De experimentele resultaten met deze stam worden verder buiten beschouwing gelaten.

Tabel 6. De faaggevoeligheid van de stafylokokken-  
stammen voor de B-, A- en F-faag uitgedrukt in  
aantallen R.T.D.

STAM	FAAGGEVOELIGHEID IN AANTALLEN		
	R.T.D. VOOR		
	B-FAAG	A-FAAG	F-FAAG
V4	0	0	0
CV4(-B)	1000	0	0
CV4(-B)(B)	0	0	0
CV4(-B,A)	1000	100	0
CV4(-B,A)(A)	1000	0	0
CV4(-B,A,F)	1000	100	5000
CV4(-B,A,F)(A)	1000	0	5000
CV4(-B,A,F)(F)	1000	100	0
L62(Leuc <sup>1</sup> )	0	100	0
L62(Leuc <sup>1</sup> )(A)	0	0	0
BF34(Kin <sup>-</sup> )	0	0	5000
BF34(Kin <sup>-</sup> )(F)	0	0	0
S57	5000	20.000	5000
S57(F)	5000	20.000	0
S57(A)	5000	0	5000

Symbolen: C = genezen (cured)

-B = genezen voor B-faag

(B) = gelysogeniseerd met B-faag

0 = geen faagreacties waargenomen

## HET FAAGPATROON

Alle genezen varianten van de V4, de weer gelysogeniseerde stammen, de S57 en haar gelysogeniseerde varianten werden tegelijk gefaagtypeerd in de R.T.D. en R.T.D.x 100. De resultaten zijn weergegeven in tabel 7. Daarin zijn de faagreacties van de fagen van groep II en III in de R.T.D. niet opgenomen, omdat faagreacties bij stam V4 en zijn varianten niet werden waargenomen. Stam S57 toonde in de R.T.D. wel faagreacties voor fagen van groep III maar deze verschilden niet wezenlijk van de faagreacties in de R.T.D.x 100. Zwakke reacties (1-15 plaques) en verschillen in sterkte werden buiten beschouwing gelaten.

Vergeleken met stam V4 is CV4(-B) in de R.T.D. gevoelig geworden voor faag 52, 52A en 80 en in de R.T.D.x 100 ook nog voor faag 79. De verandering is blijkbaar karakteristiek voor het verlies van B-faag.

Stam CV4(-B,A) werd gevoelig voor faag N in de R.T.D. en voor faag 7 in de R.T.D.x 100, hetgeen als karakteristiek voor het verlies van de A-faag kan gelden.

Het verlies van de F-faag bij de CV4(-B,A,F) deed een gevoeligheid voor faag 81 ontstaan in de R.T.D. en voor faag 42E in de R.T.D.x 100.

Stam BF34(Kin<sup>-</sup>) toonde de karakteristieke veranderingen voor het verlies van F-faag en stam L62(Leuc<sup>1</sup>) voor het verlies van de A-faag, met uitzondering van de gevoeligheid in de 100 R.T.D. voor faag 52.

Uit de tabel blijkt eveneens dat voor faagverlies kenmerkende veranderingen door lysogenisatie tot verdwijnen worden gebracht. Bij de gelysogeniseerde varianten van S57 werden soortgelijke veranderingen waargenomen.

## CONCLUSIE

Door de moederstam V4 achtereenvolgens te genezen van de aanwezige profagen werd aangetoond dat de stam drager was van minstens drie profagen. Deze fagen behoren tot groep B, A en F. Na lysogenisatie van deze varianten en de mutanten BF34(Kin<sup>-</sup>) en L62(Leuc<sup>1</sup>) met de serologisch zuivere fagen, waarvoor de stammen gevoelig waren gebleken, konden de stammen onderling worden vergeleken in faagpatroon en gevoeligheid voor de drie zuivere fagen. Hieruit kon worden geconcludeerd dat de stafylokinase-

Tabel 7. De waargenomen faagreacties bij faagtypering in de R.T.D. voor de fagen van groep I en in 1000 R.T.D. voor de fagen van groep I en III.

	DE FAAGREACTIES VOOR DE FAGEN							DE FAAGREACTIES VOOR DE FAGEN VAN GROEP I EN III IN DE R.T.D. x 100																				
	VAN GROEP I IN DE R.T.D.																											
STAMMEN	29	52	52A	79	80	81	N	29	52	52A	79	80	81	N	6	7	47	53	54	88	83A	75	77	84	42E	44B	85	42D
V4	++							++							±				±		±							
CV4 (-B)	++	++	+	±	++			++	++	++	++	++			±				±		±	±						
CV4 (-B) (B)	++							++																				
CV4 (-B, A)	++	++	+	±	++		+	++	++	++	++	++		++	+	++	±		±				±		±			
CV4 (-B, A) (A)	++	++	+	±	++			++	++	++	++	++		+					+			±	±	±		±		
CV4 (-B, A, F)	++	++	+	±	++	+	+	++	++	++	++	++	++	++	±	+					±				++			±
CV4 (-B, A, F) (A)	++	++	+	±	++	+		++	++	++	++	++	++	+					+		±	±	±		++			
CV4 (-B, A, F) (F)	++	++	+	±	++		+	++	++	++	++		++	+	++								+	±	±	±		
L62	++					+		++	++					++		++		±							±			
L62 (A)	++							++	++						±													
BF34	++					+		++					++												++			
BF34 (F)	++							++																				
S57	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	±	++	++	++	++	++	++	++
S57 (A)	++	++	++	++	++	++		++	++	++	++	++		++		++	++	++	++	++	±	++	++	++	++	++	++	++
S57 (F)	++	++	++	++	++		++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	±	++	++	++	++	++	++	++

Symbolen: (-B) : genezen voor faag B  
 (B) : gelysogeniseerd met faag B  
 ++ : meer dan 50 plaques  
 + : 16-49 plaques  
 ± : 1-15 plaques

verliesmutant BF34(Kin<sup>-</sup>) en de mutant L62(Leuc<sup>1</sup>), die slechts een minimale leucocidineproductie toonde, waren genezen voor respectievelijk een F- en een A-faag.

#### D. LYSOGENE CONVERSIE VAN DE STAM V4 NAAR PRODUCTIE VAN STAFYLOKINASE EN VERANDERING IN LEUCOCIDINEPRODUCTIE DOOR TWEE SEROLOGISCH VERSCHILLENDE PROFAGEN.

Van de verliesmutant voor stafylokinase BF34(Kin<sup>-</sup>) werd waarschijnlijk gemaakt dat hij genezen was voor een profaag die serologisch een F-faag bleek te zijn. De verliesmutant voor leucocidine L62(Leuc<sup>1</sup>) leek genezen van een tot groep A behorende profaag. Deze veranderingen van eigenschappen en het verlies van profaag zouden een coïncidentie kunnen zijn, maar kunnen ook causaal met elkaar samenhangen, namelijk wanneer lysogene conversie in het spel zou zijn. Deze vraagstelling werd onderzocht door van alle genezen en gelysogeniseerde stammen een aantal eigenschappen met name de productie van stafylokinase en leucocidine te onderzoeken. Het bewijs van het bestaan van een lysogene conversie zou zijn geleverd wanneer zou blijken dat de verandering van een eigenschap altijd is gekoppeld aan de aan- of afwezigheid van een profaag. Bovendien werd nagegaan of de converterende fagen bij een geheel andere stam dan V4 dezelfde conversieverschijnselen veroorzaken.

#### ORIENTEREND ONDERZOEK NAAR VERSCHILLEN IN EIGENSCHAPPEN.

De drie van profaag genezen stammen CV4(-B), CV4(-B,A) en de faagvrije CV4(-B,A,F) werden onderzocht op alle eigenschappen van S. aureus, zoals in hoofdstuk 2 is aangegeven. Stam CV4(-B) produceerde na 8 uur bebroeden evenveel leucocidine als V4. Stam CV4(-B,A) produceerde 5 MLeD (minimum leucocidal dose) leucocidine terwijl stam V4 150 MLeD produceerde. Stam CV4(-B,A,F) produceerde eveneens slechts 5 MLeD leucocidine, maar vormde ook geen stafylokinase. Productie van  $\beta$ -toxine werd niet waargenomen.

## LYSOGENE CONVERSIE NAAR VERANDERING IN LEUCOCIDINEPRODUCTIE DOOR EEN PROFAAG VAN GROEP A.

De stam V4 en de van profaag genezen en weer gelysogeniseerde varianten van V4, L62(Leuc<sup>1</sup>) en de met de A-faag gelysogeniseerde L62(Leuc<sup>1</sup>) werden onderzocht op leucocidineproductie. Ook stam S57 en de met de A- en F-faag gelysogeniseerde varianten werden hierop onderzocht.

De leucocidineproductie werd nagegaan onder voor alle stammen gelijke omstandigheden met name op hetzelfde tijdstip, na 8 uur bebroeden in een schudwaterbad, en met hetzelfde CCY medium, aangezien de opbrengst aan leucocidine sterk afhankelijk is van de kwaliteit van het medium. Het maken van leucocidinepreparaten, de MLeD en L+ bepaling, zijn uiteengezet in hoofdstuk 2. Voor de L+ bepaling werd het standaard anti-leucocidineserum (Skegg en Anderson, 1969) gebruikt en niet het eigen anti-leucocidineserum. Eén L+ per ml komt ongeveer overeen met 500 MLeD (Gladstone en van Heyningen, 1957).

In tabel 8 zijn de resultaten van de MLeD en L+ bepalingen weergegeven. Stam V4 bleek een matige leucocidineproductie (0,25 L+/ml) te hebben, die na genezing van de A-faag met een factor 25 verminderde. Alle stammen die van de A-faag waren genezen, hadden een lagere leucocidineproductie in dezelfde grootte-orde als CV4(-B,A). De stammen die met de A-faag waren gelysogeniseerd toonden weer dezelfde leucocidineproductie als stam V4. Ook S57, gelysogeniseerd met de A-faag, toonde een hogere leucocidineproductie.

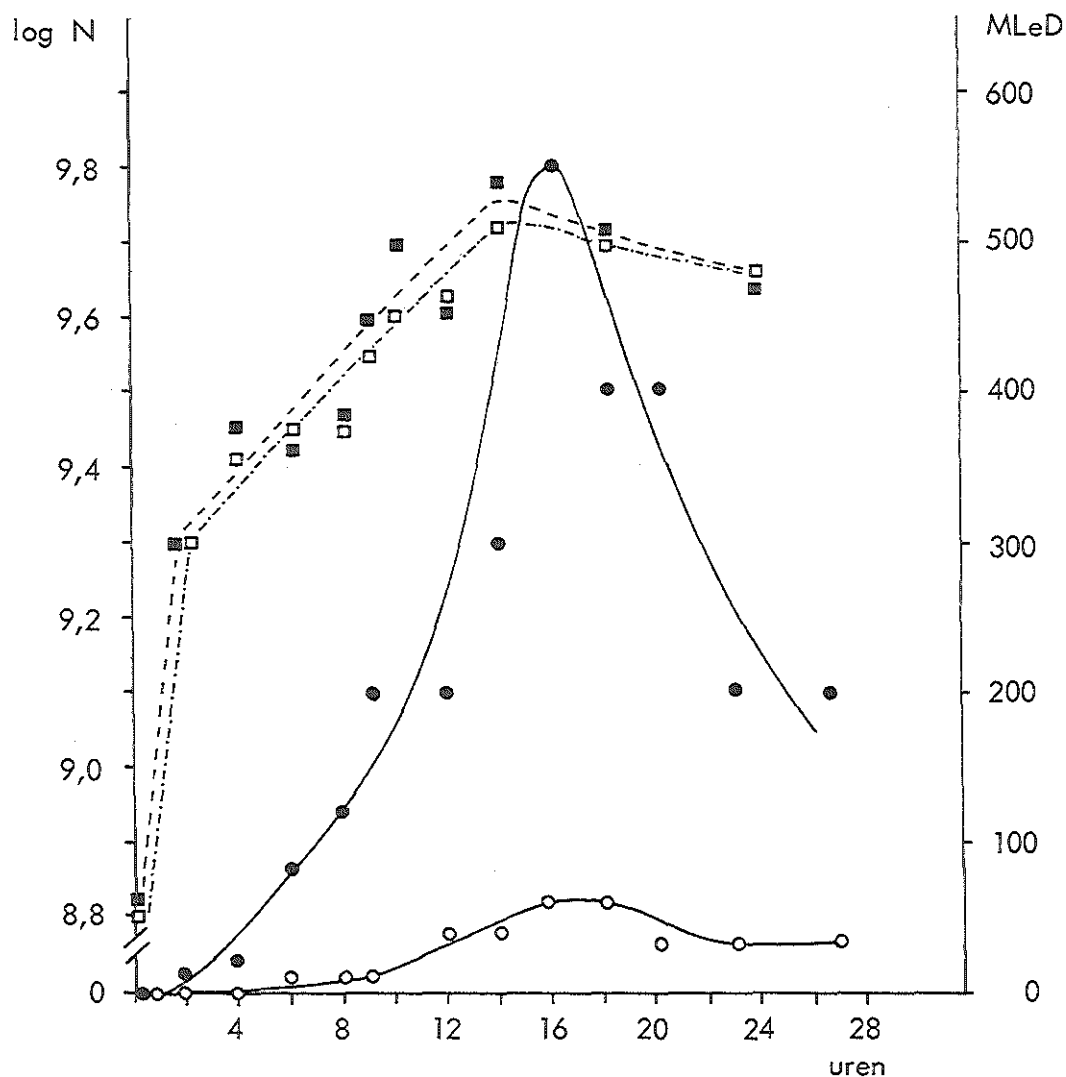
Vervolgens werd onderzocht hoe de leucocidineproductie van de faagvrije CV4(-B,A,F) en de met A-faag gelysogeniseerde CV4(-B,A,F)(A) in de tijd verliep. Een reeks Roux-flesjes werden, zoals aangegeven is in hoofdstuk 2 op pagina 15, op de gebruikelijke wijze beënt. Op verschillende tijdstippen werd de leucocidineproductie bepaald in MLeD. Het aantal bacteriën werd bepaald door de cultuur met een spectrofotometer door te meten (zie hiervoor hoofdstuk 2, pagina 18). In figuur 1 is te zien dat de faagvrije CV4(-B,A,F) in het tijdsverloop van 0 tot 27 uur een maximale leucocidineproductie bereikt van 60 MLeD. Stam CV4(-B,A,F)(A) bereikt een productie van 550 MLeD. Het valt bovendien op dat na 8 uur de leucocidineproductie nog aanzienlijk toeneemt, ondanks de thermolabiliteit van het

Tabel 8. De leucocidineproductie van stafylokokken die lysogeen of genezen zijn voor een profaag uit groep A. De leucocidineproductie is uitgedrukt in aantallen MLeD bij de MLeD bepaling en in aantal L<sub>+</sub>/ml bij de L<sub>+</sub> bepaling. De bepaling werd uitgevoerd na 8 uur bebroeden.

STAM	AANTALLEN MLeD	AANTALLEN L <sub>+</sub> /ML
V4	125	0,25
CV4(-B)	125	0,25
CV4(-B)(B)	150	0,25
CV4(-B,A)	5	0,01
CV4(-B,A)(A)	150	0,20
CV4(-B,A,F)	5	0,0063
CV4(-B,A,F)(A)	150	0,20
CV4(-B,A,F)(F)	5	0,016
L62	5	0,0078
L62(A)	150	0,25
S57	5	0,013
S57(A)	60	0,1
S57(F)	4	0,005

leucocidine. In figuur 1 is eveneens te zien dat de groeicurven van beide stammen niet lijken te verschillen.

Het verband tussen de aanwezigheid van de A-faag en de vermeerdering van leucocidineproductie werd tenslotte nog onderzocht in het volgende experiment. S57 en de A-faag werden 5 minuten geïncubeerd bij 30°C, waarbij de verhouding van faag ten opzichte van het aantal bacteriën op 200:1 werd gekozen. Overlevende bacteriën werden op lysogeniteit voor de A-faag onderzocht door losliggende kolonies loodrecht te enten op een te voren aangebrachte entstreep van faag met een sterkte van R.T.D.x 100. Van de 63 op deze wijze onderzochte kolonies bleken er 34 ongevoelig voor de A-faag te zijn. Hiervan werden er 10 onderzocht op leucocidine-



Figuur 1. Groeicurven en leucocidineproductie, uitgedrukt in MLeD, van stam CV4(-B,A,F) en stam CV4(-B,A,F)(A).

log N = log aantal bacteriën per ml

Tijd 0 is het moment waarop vers CCY medium aan de voorcultuur wordt toegevoegd.

- leucocidineproductie van stam CV4(-B,A,F)
- leucocidineproductie van stam CV4(-B,A,F)(A)
- groeicurve van stam CV4(-B,A,F)
- groeicurve van stam CV4(-B,A,F)(A)



productie na 16 uur bebroeden. Al deze stammen bleken tienmaal zoveel leucocidine te produceren als de moederstam. Dit was eveneens het geval wanneer eenzelfde experiment met stam CV4(-B,A,F) werd uitgevoerd (van der Vijver en medewerkers, 1972).

Tenslotte werd nog geprobeerd of de fagen Nobel en 7, beide uit groep A, dezelfde lysogene conversie teweeg konden brengen bij de stammen CV4(-B,A,F) en S57. Lysogenisatie met deze fagen resulteerde niet in een verhoging van de leucocidineproductie.

#### LYSOGENE CONVERSIE NAAR PRODUCTIE VAN STAFYLOKINASE DOOR EEN PROFAAG VAN GROEP F.

Bij stam CV4(-B,A,F) kon stafylokinase niet meer worden aangetoond. Na lysogenisatie met de F-faag werd weer stafylokinaseproductie gevonden. Ook de mutant BF34(Kin<sup>-</sup>) toonde na lysogenisatie met de F-faag weer stafylokinaseproductie. Geen der van de F-faag genezen stammen produceerde  $\beta$ -toxine. Het lijkt aannemelijk dat de stam V4 genetisch niet in staat is tot  $\beta$ -toxineproductie, aangezien stam S57, die  $\beta$ -toxine<sup>+</sup> en kinase<sup>-</sup> was, na lysogenisatie met de F-faag, stafylokinase ging vormen, terwijl de  $\beta$ -toxinevorming niet meer aantoonbaar was. Stam S57, gelysogeniseerd met de A-faag, bleef  $\beta$ -toxine vormen.

#### BESPREKING EN CONCLUSIE.

De leucocidineproductie van stam V4 staat onder invloed van een profaag uit groep A, terwijl de stafylokinaseproductie onder invloed staat van een profaag uit groep F. Elke conversie was onafhankelijk van de andere op te wekken.

De converterende fagen veroorzaakten eveneens lysogene conversie na lysogenisatie van een andere stam, namelijk S57. Lysogene conversie naar stafylokinaseproductie was bij deze stam gekoppeld aan het verlies van  $\beta$ -toxineproductie.

Lysogene conversie naar productie van stafylokinase en verlies van  $\beta$ -toxine door fagen uit groep F is aangetoond door Winkler en medewerkers (1965). Lysogene conversie naar productie van leucocidine is niet beschreven.

De varianten van stam V4 die de A-faag niet bezitten en de faagvrije stam S57 zijn wel in staat tot enige leucocidineproductie. Beide componenten van het leucocidine kunnen dus, zij het in beperkte mate, worden geproduceerd. Theoretisch is het mogelijk dat de aanwezigheid van de A-faag in het genoom van de bacterie de synthese van één of beide componenten van het leucocidine beïnvloedt. Een andere mogelijkheid is dat het transportmechanisme wordt beïnvloed. Het mechanisme van deze lysogene conversie werd echter niet verder onderzocht.

Tenslotte werd aannemelijk gemaakt dat de veranderingen in eigenschappen bij de overige mutanten niet worden veroorzaakt door een wijziging in het profaag-genotype.

## Hoofdstuk 4

### ONDERZOEK NAAR VERSCHILLEN IN VIRULENTIE TUSSEN MOEDERSTAM EN MUTANTEN IN HET DIEREXPERIMENT

#### I N L E I D I N G

Een klassieke methode om virulentiefactoren van micro-organismen te bestuderen is het vergelijken van eigenschappen van virulente en avirulente stammen. Een onderzoek naar virulentieverschillen tussen moederstam en mutanten die bij voorkeur slechts in één eigenschap van de oorspronkelijke stam verschillen, is een variant van een dergelijke benadering. Voor de interpretatie van dergelijke experimenten is het noodzakelijk dat de stammen goed zijn gekarakteriseerd. Immers, wanneer een verliesmutant in virulentie verschilt, dan mag dit verschil in het algemeen alleen aan de ontbrekende factor worden toegeschreven als de mutant verder in alle andere eigenschappen met de moederstam overeenkomt.

De monomutanten B21( $\alpha\text{Tox}^1$ ), BH5( $\alpha\text{Tox}^1$ ) en B1(Coag<sup>1</sup>) en de stammen BF34(Kin<sup>-</sup>) en L62(Leuc<sup>1</sup>) bij wie de verandering in eigenschap berust op verlies van een profaag, verschillen in slechts één eigenschap van de moederstam V4. De faagvrije stam CV4(-B,A,F) zal in een aantal experimenten in de plaats van de stammen BF34(Kin<sup>-</sup>) en L62(Leuc<sup>1</sup>) worden onderzocht omdat deze stam genezen is van alle profagen van stam V4; deze stam is dus te beschouwen als representatief voor zowel stam BF34(Kin<sup>-</sup>) als L62(Leuc<sup>1</sup>). Behalve deze stammen zullen ook de dubbelmutanten BT22( $\alpha\text{Tox}^-$ , Leuc<sup>1</sup>) en BS36( $\delta\text{Tox}^-$ , Leuc<sup>1</sup>) met de moederstam worden vergeleken. De interpretatie van mogelijke virulentieverschillen zal bij laatstgenoemde mutanten moeilijkheden kunnen geven omdat men immers met meer dan één verandering te maken heeft. Tenslotte zal worden nagegaan of de mutanten B29(Coag<sup>1</sup>,  $\alpha\text{Tox}^-$ , DNase<sup>1</sup>, Leuc<sup>1</sup>) en BB16( $\alpha\text{Tox}^-$ ,  $\delta\text{Tox}^-$ , DNase<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>),

die een groot aantal eigenschappen hebben verloren en in vitro een lagere groeisnelheid hebben dan de moederstam, nog in staat zijn zich in vivo te vermeerderen.

Het onderzoek naar virulentieverschillen zal worden gedaan in het dierexperiment. De muis werd als proefdier gekozen. Over infecties bij de muis door S. aureus is onder andere onderzoek gedaan door Selbie en Simon (1952), Gorrill (1958), Karas en Kapral (1962), Gorrill en McNeil (1963) en Fisher en Robson (1963). Uit deze onderzoekingen blijkt ondermeer dan de minimale lesie-vormende dosis, de letale dosis en het tijdstip van de dood verschillen voor de verschillende besmettingswegen. Bovendien bleek het niet altijd mogelijk precies vast te stellen wat er zich in vivo afspeelde.

Voor vergelijkend virulentieonderzoek werden drie experimentele modellen gebruikt, namelijk subcutane injectie van de moederstam en mutanten bij normale muizen en bij muizen bij wie door een totale lichaamsbestraling de algemene weerstand was verzwakt. In de derde plaats werd het effect van intraveneuze injectie van de stammen vergeleken. Deze experimentele modellen voor het onderzoek naar virulentieverschillen hebben alle drie het nadeel dat de fase van penetratie van de bacterie in de gastheer wordt overgeslagen.

De muis is niet geschikt om de bijdrage van P-V leucocidine (leucocidine) tot de virulentie van S. aureus te onderzoeken omdat leucocyten en macrofagen van deze diersoort niet gevoelig zijn (Gladstone en van Heyningen, 1957). Een oriënterend onderzoek naar het belang van dit toxine als virulentiefactor werd daarom gedaan met konijnen.

## M A T E R I A A L   E N   M E T H O D E N

### STAMMEN.

Deze zijn beschreven in hoofdstuk 2 en 3. Voor elk experiment werd een nieuwe gevriesdroogde cultuur gebruikt. Tijdens de dierproeven werden de stabiliteit en de reinheid van de mutanten nagegaan door uit de lesies te kweken en de geïsoleerde cultuur te onderzoeken op de relevante eigenschap. Slechts éénmaal werd een verandering in eigenschappen opgemerkt zodat het experiment moest worden herhaald met een nieuwe cultuur.

### MUIZEN.

Alle huidproeven werden gedaan met een ingeteelde witte muizenstam A.J.N.P.L., die in het Centraal Proefdierenbedrijf van de Medische Faculteit te Rotterdam werd voortgekweekt. De overige experimenten werden gedaan met Swiss muizen, die waren verkregen van het Centraal Proefdierenbedrijf T.N.O. te Zeist. De muizen waren 12 tot 14 weken oud, hadden een gewicht van 20 tot 25 gram en waren van het vrouwelijke geslacht. Voor subcutane injectie werd de rug huid van de muis met een tondeuze geschoren en de resterende beharing werd vervolgens verwijderd met een ontharingspasta (samenstelling: Barium sulfide 300 g, Amylum solani 280 g, Talcum venet. 280 g, Sapo med. 40 g, aqua totdat een pasta ontstaat).

### BEREIDING VAN HET INOCULUM.

Van een 16 uren cultuur in vleesbouillon werd 0,5 ml overgebracht in 20 ml verse bouillon. Na 6 uur schudden in een schudwaterbad bij 37°C werden de bacteriën driemaal gewassen in fysiologisch zout. Wanneer een hoge dosis kolonievormende eenheden (K.V.E.) moest worden ingespoten, werd een grotere hoeveelheid bouillon beënt en geconcentreerd. Aanvankelijk werd het aantal K.V.E. van te voren bepaald door de culturen door te meten in een spectrofotometer zoals is uiteengezet op pagina 18. Later werd dit achterwege gelaten toen bleek dat het

aantal K.V.E. slechts weinig varieerde wanneer de omstandigheden gelijk werden gehouden. Gewassen culturen werden vervolgens met fysiologisch zout verdund en de gewenste verdunning werd met een plastic mantouxspuitje en een naald van 0,5 x 16 mm ingespoten. Bij subcutane injectie in de rughuid werd 0,1 ml, bij intraveneuze injectie in een staartvene werd 0,5 ml toegediend. Voor het volume van 0,1 ml werd de betrouwbaarheid van de dosis nagegaan door een dosis van  $7,2 \cdot 10^6$  K.V.E. zesmaal te tellen. De standaardfout van het gemiddelde was  $0,6 \cdot 10^6$ . Het aantal K.V.E. in de culturen werd bepaald door een telling te verrichten op bloedagar volgens de method van Miles en Misra (1938). In den regel werd als controle de ingespoten verdunning op het eind van de proef eveneens geteld.

#### BEPALING VAN HET AANTAL K.V.E. IN ORGANEN.

Muizen werden gedood met etherdamp. Voor het bepalen van het aantal K.V.E. in de huid werd een huidlapje van 2x2 cm uitgeknipt. Hethuidlapje werd 60 seconden gehomogeniseerd in een Ultra-Turrax weefseldesintegrator (model 18/2, Janke en Kunkel K.G., Staufen, i.B.R., W. Duitsland) in een volume van 5 ml fysiologisch zout. Tijdens het desintegreren werd gekoeld met ijswater. Na desintegratie van de huid blijven er slierten collageen over, die werden verwijderd door filtratie door verbandgaas. Het aantal K.V.E. in de nieren werd bepaald door beide nieren uit te nemen volgens de techniek van Himmelweit (1944) en deze in 5 ml fysiologisch zout te desintegreren. De weefseldesintegrator werd na elke destructie 5 seconden in 5 ml fysiologisch zout gespoeld. Deze 5 ml werd gevoegd bij de 5 ml weefselhomogenaat. Vervolgens werd de weefseldesintegrator enkele malen gespoeld met kraanwater, waarna 5 minuten in kokend water werd ontsmet. Vervolgens werd een verdunningsreeks van het weefselhomogenaat gemaakt en het aantal K.V.E. bepaald volgens de method van Miles en Misra (1938). Het aantal K.V.E. werd opgegeven per orgaan (huidlap, beide nieren). De betrouwbaarheid van de huidtelling werd onderzocht voor de dosis  $5,0 \cdot 10^6$  bij 4 muizen. De huid werd 5 minuten na injectie uitgeknipt en de standaardfout van het gemiddelde ( $5,2 \cdot 10^6$ ) was  $0,4 \cdot 10^6$ .

## RONTGENBESTRALING VAN MUIZEN.

Muizen werden bestraald met een Philips-röntgenapparaat (afdeling celbiologie en histologie 2, Medische Faculteit, Rotterdam). De proefdieren bevonden zich in groepjes van 8 in een perspex kamertje. De afstand tussen het brandpunt van de buis en de bodem van de kooi was 53 cm. Er werd een Cu-filter gebruikt van 1 mm. De stralingskwaliteit was 250 Kv en 10 mA, waarmee onder de bovengenoemde omstandigheden een doseringssnelheid werd bereikt van 30 tot 35 Röntgen (R) per minuut. De exposie in Röntgen correspondeert met een geabsorbeerde dosis in zacht weefsel van 0,95 Rad.

## STATISTIEK.

De verdelingsvrije toets van Wilcoxon voor 2 steekproeven werd uitgevoerd volgens "de Handleiding voor de toets van Wilcoxon" (Rapport S176, M65) van de Statistische Afdeling, Mathematisch Centrum te Amsterdam. Voor de overige statistische methoden wordt verwezen naar "Inleiding tot de Medische Statistiek" deel I en deel II door H. de Jonge (uitgave afdeling Statistiek van het Nederlands Instituut voor Preventieve Geneeskunde, 2e druk, 1963).

## R E S U L T A T E N

### A. ONDERZOEK NAAR VIRULENTIEVERSCHILLEN TUSSEN MOEDERSTAM EN MUTANTEN NA SUBCUTANE INJECTIE BIJ DE MUIS.

De minimale pusvormende dosis van virulente S. aureus stammen bij de muis is bij deze besmettingsweg ongeveer  $10^6$  K.V.E. (Fisher en Robson, 1963). Sommige stammen hebben een hogere dosis nodig om een infectie te veroorzaken. Bij dergelijke stammen zoals stam Wood 46 ontbreekt een agressine dat zich in de celwand bevindt (Hill, 1968).

Stam V4 is bij subcutane injectie virulent voor de muis. Pustels of kleine abscessen werden waargenomen vanaf de dosis  $10^6$  K.V.E. (zie hoofdstuk 2, pagina 22). De stam bezit het in de celwand gelocaliseerde agressine (zie hoofdstuk 5).

#### VERGELIJKING VAN DE ZICHTBARE LESIES BIJ DE MUIS NA SUBCUTANE INJECTIE VAN MOEDERSTAM EN DE MUTANTEN.

Alle monomutanten en de mutanten BS36( $\delta\text{Tox}^-$ , Leuc<sup>1</sup>) en BT22( $\alpha\text{Tox}^-$ , Leuc<sup>1</sup>) werden vergeleken met de moederstam V4. De lesies werden 24 uur na injectie afgelezen en genoteerd zoals aangegeven op pagina 22. Na 24 uur veranderde de lesiescore niet noemenswaardig.

In tabel 1 zijn de resultaten voor de verschillende doses K.V.E. weergegeven. Alle verliesmutanten voor  $\alpha$ -toxine verschilden van de moederstam doordat ze zelfs in de hoogste dosis geen enkele maal necrose veroorzaakten. De  $\delta$ -toxine verliesmutant BS36( $\delta\text{Tox}^-$ , Leuc<sup>1</sup>), die waarschijnlijk evenveel  $\alpha$ -toxine produceert als de moederstam, vormde alleen in de hoogste dosis necrose. Mutant B1(Coag<sup>1</sup>) en de faagvrije stam CV4(-B,A,F)<sup>x</sup>, die stafylokinase<sup>-</sup> is en minder leucocidine maakt, verschilden niet van de moederstam.

In de nu volgende experimenten zal worden nagegaan of het aantal K.V.E. in de lesies veroorzaakt door de moederstam en de mutanten verschillen. Dit werd ondernomen om na te gaan of met name  $\alpha$ -toxine de groei in vivo bevordert.

#### VERGELIJKING VAN HET AANTAL K.V.E. IN DE HUID NA SUBCUTANE INJECTIE VAN MOEDERSTAM EN MUTANTEN.

De veronderstelling dat het aantal K.V.E. in de lesies van de mutanten van de moederstam verschilt wanneer de stammen in vergelijkbare doses zouden worden ingespoten, werd onderzocht door het aantal K.V.E. in de huid 24 uur na injectie te vergelijken. Het tijdstip 24 uur werd gekozen omdat vermeerdering van bacteriën, zoals uit tabel 2 blijkt, tot 24 uur na injectie plaats vindt en daarna niet meer.

x De stammen BF34(Kin<sup>-</sup>) en L62(Leuc<sup>1</sup>) zijn eveneens onderzocht maar verschilden zoals te verwachten was eveneens niet van de moederstam.



Tabel 1. Vergelijking van de lesiescore bij muizen 24 uur na subcutane injectie van verschillende doses K.V.E. van moederstam en enkele mutanten.

STAM	DOSIS IN K.V.E.	AANTAL MUIZEN	GEMIDDELDE LESIESCORE <sup>x</sup>	SIGNIFICANTIE VAN HET VERSCHIL <sup>+</sup>
V4	1,8.10 <sup>6</sup>	14	1,2	
	2,5.10 <sup>6+</sup>	8	2,0	
	3,1.10 <sup>6+</sup>	24	1,7	
	5,1.10 <sup>6</sup>	8	2,0	
	7,8.10 <sup>6</sup>	5	2,0	
BH5 (αTox <sup>1</sup> )	2,7.10 <sup>6+</sup>	8	1,0	P<0,001
	3,9.10 <sup>6+</sup>	26	0,9	P<0,001
	7,1.10 <sup>6</sup>	8	1,0	
	2,2.10 <sup>7</sup>	8	1,0	
B21 (αTox <sup>1</sup> )	2,3.10 <sup>6+</sup>	6	1,0	P<0,001
	4,2.10 <sup>6</sup>	6	0,8	
	9,0.10 <sup>6</sup>	6	1,0	
BT22 (αTox <sup>-</sup> , Leuc <sup>1</sup> )	3,0.10 <sup>6+</sup>	8	1,0	P<0,001
BS36 (αTox <sup>-</sup> , Leuc <sup>1</sup> )	2,2.10 <sup>6+</sup>	6	0,8	P<0,001
	4,4.10 <sup>6</sup>	6	1,0	
	8,2.10 <sup>6</sup>	4	2,0	
CV4 (-B,A,F)	3,0.10 <sup>6+</sup>	6	2,0	geen verschil
B1 (Coag <sup>1</sup> )	2,7.10 <sup>6+</sup>	6	2,0	geen verschil
	4,4.10 <sup>6</sup>	6	2,0	

x pustel, voelbaar abscesje of necrotisch gebied  $< \frac{1}{2}$  cm werd genoteerd als 1; necrotisch gebied  $> \frac{1}{2}$  cm werd genoteerd als 2.

+ het verschil in lesiescore ten opzichte van stam V4 van de met + en ± gemerkte doses werd getoetst volgens de Yates-toets.

Tabel 2. Aantal K.V.E. in de huid op verschillende tijdstippen in uren na subcutane injectie van de moederstam V4 in een dosis van  $1,6 \cdot 10^6$  K.V.E.

TIJD IN UREN NA SUBCUTANE INJECTIE	AANTAL K.V.E. PER MUIS				GEMIDDELDE LESIESCORE
	1	2	3	4	
1	$5,3 \cdot 10^5$	$3,8 \cdot 10^5$	$9,0 \cdot 10^5$	$6,2 \cdot 10^5$	0
8	$3,4 \cdot 10^6$	$6,2 \cdot 10^6$	$3,1 \cdot 10^6$	$6,1 \cdot 10^6$	0
24	$1,2 \cdot 10^7$	$2,9 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^7$	2
48	$2,1 \cdot 10^6$	$4,6 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^7$	$5,9 \cdot 10^6$	2

Het aantal K.V.E. in de huid dat 24 uur na injectie van de stam BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>) werd gevonden, werd vervolgens vergeleken met de aantallen die bij de moederstam werden gevonden.

Uit tabel 3 blijkt dat het aantal K.V.E. in de lesies van deze stam

Tabel 3. Aantal K.V.E. in de huid van 2 groepen van 7 muizen 24 uur na subcutane injectie van stam V4 en stam BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>).

STAM V4 DOSIS $2,2 \cdot 10^6$		STAM BH5( $\alpha$ Tox <sup>1</sup> ) DOSIS $3,2 \cdot 10^6$	
AANTAL K.V.E.	LESIESCORE <sup>x</sup>	AANTAL K.V.E.	LESIESCORE <sup>+</sup>
$1,4 \cdot 10^7$	1	$1,9 \cdot 10^6$	1
$5,4 \cdot 10^6$	1	$8,6 \cdot 10^5$	1
$1,6 \cdot 10^7$	1	$6,0 \cdot 10^6$	1
$4,5 \cdot 10^6$	1	$7,3 \cdot 10^6$	1
$5,8 \cdot 10^6$	1	$9,9 \cdot 10^5$	1
$7,5 \cdot 10^6$	1	$5,6 \cdot 10^6$	1
$8,2 \cdot 10^6$	1	$2,2 \cdot 10^6$	1

x wel enige necrose maar kleiner dan  $\frac{1}{2}$  cm.

+ geen necrose

in dit experiment lager is dan van de moederstam (tweezijdig getoetst volgens Wilcoxon  $0,01 < P < 0,05$ ).

In een tweede experiment met groepen van 8 muizen waarbij het aantal K.V.E. in de lesies van stam V4 (dosis  $2,5 \cdot 10^6$ ) en BH5 (dosis  $3,2 \cdot 10^6$ ) na 12 en 24 uur werd vergeleken, kon helaas geen significant verschil worden aangetoond ( $P = 0,1$  voor de 12 uren waarden en  $P = 0,26$  voor de 24 uren waarden).

De stammen B1(Coag<sup>1</sup>), de faagvrije CV4(-B,A,F), die stafylokinase<sup>-</sup> is en minder leucocidine produceert en stam BS36( $\delta$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>), bleken niet van de moederstam te verschillen wanneer de volgende doses werden vergeleken:

V4	: $2,5 \cdot 10^6$
B1(Coag <sup>1</sup> )	: $4,4 \cdot 10^6$
CV4(-B,A,F)	: $3,0 \cdot 10^6$
BS36( $\delta$ Tox <sup>-</sup> , Leuc <sup>1</sup> )	: $4,0 \cdot 10^6$

De interpretatie van deze experimenten is moeilijk wat betreft de  $\alpha$ -toxine verliesmutanten. Het aantal K.V.E. dat in de lesies werd gevonden, toonde in vergelijking met de moederstam een tendens tot lagere waarden. Het verschil was slechts in één van de twee experimenten statistisch significant.

De verschillen zijn onder deze proefomstandigheden waarschijnlijk zo gering dat een duidelijke uitspraak over de groei-bevorderende activiteit in vivo van  $\alpha$ -toxine niet kon worden gegeven.

#### CONCLUSIE.

$\alpha$ -Toxine verliesmutanten veroorzaken nimmer necrose wanneer ze in een dosis variërend van  $10^6$  tot  $2 \cdot 10^7$  K.V.E. subcutaan worden ingespoten. De vraagstelling of  $\alpha$ -toxine de groei in vivo bevordert kon niet met zekerheid worden beantwoord.

Aangezien de  $\delta$ -toxine verliesmutant BS36, die evenveel  $\alpha$ -toxine als de moederstam produceert, pas in een hoge dosis necrose geeft, lijkt het waarschijnlijk dat  $\delta$ -toxine de dermonecrotische activiteit van  $\alpha$ -toxine versterkt.

De stammen B1(Coag<sup>1</sup>) en de faagvrije variant CV4(-B,A,F) die stafylokinase<sup>-</sup> is en minder leucocidine maakt, verschillen bij deze wijze van besmetting niet van de moederstam V4, noch in vorm van de lesie noch in het aantal K.V.E. in de lesies.

#### B. ONDERZOEK NAAR VIRULENTIEVERSCHILLEN TUSSEN MOEDERSTAM EN MUTANTEN NA INTRAVENEUZE INJECTIE BIJ DE MUIS EN HET KONIJN.

Intraveneuze injectie van S. aureus geeft bij de muis en het konijn vermeerdering van bacteriën in de nieren (Gorrill, 1958; Li en Kapral, 1962; Karas en Kapral, 1962). Het aantal K.V.E. dat kort na injectie in de nieren werd gevonden, neemt na enkele dagen toe, terwijl in longen, lever en milt het aantal tot nul afneemt. Gorrill (1958) vond bij de muis voor verschillende doses variërend van  $10^6$  tot  $3 \cdot 10^7$  K.V.E. een lineaire relatie tussen het aantal dieren met geïnfecteerde nieren en de mortaliteit na 14 dagen enerzijds en de logaritme van de doses anderzijds. Hij toonde aan dat een relatief klein gedeelte van het aantal ingespoten K.V.E. in de nieren terecht komt, waarvan zich slechts één of meer dan één vermeerderen. Gorrill wist bovendien aannemelijk te maken dat selectie van meer virulente mutanten hierbij geen rol speelde. Het sterven van de muis wordt waarschijnlijk veroorzaakt door een combinatie van nierinsufficiëntie en toxemie.

Bij een intraveneuze dosis hoger dan  $3 \cdot 10^7$  sterft een deel van de muizen binnen 24 uur. De relatie dosis en mortaliteit binnen 24 uur wordt dan gekenmerkt door een zeer klein dosistraject. De dosis waarbij 50% van de muizen binnen 24 uur stierf (LD50) was voor de experimentele stam die door Gorrill werd gebruikt ongeveer  $10^8$  K.V.E. Bij de gestorven muizen werd slechts weinig vermeerdering van het aantal K.V.E. in de nieren waargenomen. Waarschijnlijk sterft bij een dergelijke hoge dosis een deel van de muizen al na enkele delingscycli ten gevolge van toxineproductie. Overlevende muizen bleken later eveneens te sterven nu door selectieve vermeerdering van

van bacteriën in de nieren.

Op grond van bovenstaande gegevens werd eerst de vermeerdering in de nieren van de moederstam en de mutant BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>) vergeleken voor een lage dosis. Vervolgens werd voor verschillende doses van moederstam en mutanten een onderzoek gedaan naar de mortaliteit na 2 en 14 dagen en naar het percentage nierinfecties. Op grond van de verkregen resultaten werd de vermeerdering in de nieren van moederstam en enkele mutanten onderzocht voor de dosis  $10^8$  K.V.E.

#### VERGELIJKING VAN HET AANTAL K.V.E. IN DE NIEREN VAN MUIZEN NA INTRAVENEUZE INJECTIE VAN MOEDERSTAM EN MUTANT BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>).

Na intraveneuze toediening van  $6,0 \cdot 10^6$  K.V.E. van stam V4 werden muizen 2 uur en op verschillende dagen na injectie afgemaakt en geseceerd. De nieren werden uitgenomen, onderzocht op zichtbare abscessen en het aantal K.V.E. werd in beide nieren bepaald. Uit tabel 4 blijkt dat vanaf de 4e dag abscessen werden gezien gepaard

Tabel 4. Aantal K.V.E. in beide nieren van muizen op verschillende tijdstippen na i.v. injectie van stam V4 in een dosis van  $6,0 \cdot 10^6$ . Aantallen K.V.E. lager dan  $4 \cdot 10^3$  ( $<4 \cdot 10^3$ ) werden niet geteld.

AANTAL K.V.E. PER MUIS NA TIJDSTIP:				
2 uur	2 dagen	4 dagen	6 dagen	14 dagen
$3,5 \cdot 10^4 (-)^x$	$1,9 \cdot 10^4 (-)$	$2,0 \cdot 10^7 (+)$	$9,1 \cdot 10^6 (+)$	$8,4 \cdot 10^6 (+)$
$6,9 \cdot 10^3 (-)$	$7,3 \cdot 10^5 (-)$	$1,4 \cdot 10^4 (-)$	$2,4 \cdot 10^7 (+)$	$<4,0 \cdot 10^3 (+)$
				$1,2 \cdot 10^5 (+)$
				$<4,0 \cdot 10^3 (-)$
				$1,7 \cdot 10^7 (+)$
				$1,6 \cdot 10^7 (+)$
				$1,7 \cdot 10^5 (+)$
				$<4,0 \cdot 10^3 (+)$

x tussen haakjes is aangegeven of macroscopisch abscessen wel (+) of niet (-) werden waargenomen.

gaande met een duidelijke vermeerdering van het aantal K.V.E. in de nieren. Op de 14e dag werden bij alle 8 muizen abscessen in de nieren gevonden, maar dit ging niet altijd gepaard aan een hoog aantal K.V.E. in de nieren, vermoedelijk omdat de abscessen aan het genezen waren.

Op grond van deze gegevens werd de 6e dag gekozen om stam BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>) met de moederstam V4 te vergelijken. Aan twee groepen muizen werden  $1,5 \cdot 10^7$  K.V.E. van stam V4 en  $1,7 \cdot 10^7$  K.V.E. van stam BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>) intraveneus toegediend. In tabel 5 is het aantal K.V.E. dat na 6

Tabel 5. Vergelijking van aantal K.V.E. in beide nieren 6 dagen na i.v. injectie van stam V4 en BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>) in 2 groepen muizen.

---

AANTAL K.V.E. IN DE NIEREN NA INTRAVENEUZE INJECTIE VAN:

---

STAM V4 DOSIS $1,5 \cdot 10^7$	STAM BH5( $\alpha$ Tox <sup>1</sup> ) DOSIS $1,7 \cdot 10^7$
9,1.10 <sup>6</sup>	1,4.10 <sup>6</sup>
2,9.10 <sup>6</sup>	5,5.10 <sup>6</sup>
2,4.10 <sup>7</sup>	2,1.10 <sup>6</sup>
6,1.10 <sup>6</sup>	5,8.10 <sup>3</sup>
1,1.10 <sup>7</sup>	4,5.10 <sup>4</sup>
1,0.10 <sup>4</sup>	6,0.10 <sup>5</sup>
6,9.10 <sup>6</sup>	9,1.10 <sup>5</sup>
1,9.10 <sup>5</sup>	

---

dagen in de nieren werd gevonden, weergegeven. Tweezijdig getoetst volgens Wilcoxon blijkt het verschil niet significant te zijn ( $P = 0,072$ ). Het experiment werd herhaald met een groter aantal muizen. Het aantal K.V.E. in de nieren was voor de groep muizen ingespoten met stam BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>) gemiddeld lager dan de aantallen die voor stam V4 werden gevonden. Het verschil was echter wederom niet significant (Stam V4: dosis  $9,1 \cdot 10^6$ ; aantal muizen 16. Stam BH5: dosis

$1,5 \cdot 10^7$ ; aantal muizen 14. Significantie van het verschil in aantal K.V.E. in de nieren:  $P = 0,1$ ).

Het verschil tussen moederstam en mutant BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>) is, voorzover aanwezig, in deze proefopstelling blijkbaar zo gering dat een verschil in virulentie tussen beide stammen niet aantoonbaar was. Op grond van deze gegevens werden de andere mutanten niet onderzocht.

#### ONDERZOEK NAAR VERSCHILLEN IN MORTALITEIT NA INTRAVENEUZE TOEDIENING VAN VERSCHILLENDE DOSES K.V.E. VAN MOEDERSTAM EN MUTANTEN.

Groepen van gemiddeld 20 muizen (spreiding 15-23) werden met verschillende doses variërend van  $10^6$  tot  $10^9$  K.V.E. ingespoten. Dagelijks werd het aantal overleden muizen genoteerd. Bovendien werden alle gestorven en na 14 dagen nog levende muizen geseceerd en macroscopisch onderzocht op de aanwezigheid van nierabscessen.

In tabel 6 is voor verschillende doses K.V.E. van stam V4 en een aantal mutanten de vroege sterfte na 2 dagen en de totale sterfte na 14 dagen weergegeven. Uit de tabel blijkt dat de mortaliteit over een zeer klein dosistraject van 0 tot 100% toeneemt. Het bleek niet mogelijk de relatie mortaliteit en de logaritme van de dosis in een lijn vast te leggen en vervolgens deze lijnen op verschillen te analyseren. De sterfte-percentages na 2 en 14 dagen, veroorzaakt door de doses die het meest nabij  $1,0 \cdot 10^8$  en  $3,0 \cdot 10^8$  K.V.E. lagen, werden voor vergelijking uitgekozen. De stammen BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>), BT22( $\alpha$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>), BS36( $\delta$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>), BB16( $\alpha$ Tox<sup>-</sup>,  $\delta$ Tox<sup>-</sup>, DNase<sup>1</sup>, Leuc<sup>1</sup>) en B29(Coag<sup>1</sup>,  $\alpha$ Tox<sup>-</sup>, DNase<sup>1</sup>, Leuc<sup>1</sup>) veroorzaakten, wanneer ze in de bovengenoemde doses werden ingespoten, na 2 dagen een significant lagere sterfte dan de moederstam. Ook de sterfte na 14 dagen was significant lager behalve voor de hoogste dosis van stam BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>). Stam B1(Coag<sup>1</sup>) en CV4(-B,A,F) verschilden niet van de moederstam. Voor de doses lager dan  $10^8$  K.V.E. was de sterfte na 14 dagen, in vergelijking met de experimenten van Gorrill (1958), laag. Het is mogelijk dat stam V4 minder virulent is dan de stam die Gorrill gebruikte of dat de proefdieren verschillen in hun gevoeligheid voor infecties met S. aureus.

Tabel 6. Sterfte-percentages van muizen 2 en 14 dagen (M2 en M14) na intraveneuze injectie van verschillende doses K.V.E. van stam V4 en mutanten. Het aantal muizen per dosis was gemiddeld 20 (spreiding 15 tot 23). Het verschil in sterfte-percentages van de dosis  $3,1 \cdot 10^{8+}$  en  $1,0 \cdot 10^{8+}$  van stam V4 werd met de sterfte-percentages van de vergelijkbare doses van de mutanten die eveneens met + en ‡ zijn gemerkt, statistisch getoetst met de chi-kwadraat toets. Tussen haakjes is de betrouwbaarheidsdrempel (P) weergegeven; ns betekent niet significant.

V4			BH5 ( $\alpha$ Tox <sup>1</sup> )			BT22 ( $\alpha$ Tox <sup>-</sup> , Leuc <sup>1</sup> )			BS36 ( $\delta$ Tox <sup>-</sup> , Leuc <sup>1</sup> )		
DOSIS	M2	M14	DOSIS	M2	M14	DOSIS	M2	M14	DOSIS	M2	M14
$8,8 \cdot 10^8$	100	100				$8,4 \cdot 10^8$	100	100	$6,4 \cdot 10^8$	55	95
$3,1 \cdot 10^{8+}$	95	100	$4,4 \cdot 10^{8+}$	40 (P<0,001)	85 (P<0,1)	$3,8 \cdot 10^{8+}$	50 (P<0,005)	70 (P<0,005)	$3,2 \cdot 10^{8+}$	10 (P<0,001)	70 (P<0,01)
$2,0 \cdot 10^{8+}$	95	100	$2,1 \cdot 10^{8+}$	40	70						
$1,0 \cdot 10^{8+}$	89	94	$1,1 \cdot 10^{8+}$	0 (P<0,001)	0 (P<0,001)	$1,0 \cdot 10^{8+}$	15 <sup>+</sup> (P<0,001)	25 (P<0,001)	$1,6 \cdot 10^{8+}$	10 (P<0,001)	55 (P<0,01)
$3,5 \cdot 10^7$	20	35				$3,4 \cdot 10^7$	0	0	$4,2 \cdot 10^7$	0	0
$1,2 \cdot 10^7$	0	0				$1,1 \cdot 10^7$	0	0	$1,4 \cdot 10^7$	0	0
$3,9 \cdot 10^6$	0	0				$3,8 \cdot 10^7$	0	0	$4,7 \cdot 10^7$	0	0
$1,3 \cdot 10^6$	0	5				$1,3 \cdot 10^7$	0	0	$1,6 \cdot 10^7$	0	0

B1 (Coag <sup>1</sup> )			CV4 (-B, A, F)			BB16 ( $\alpha$ Tox <sup>-</sup> , $\delta$ Tox <sup>-</sup> , DNase <sup>1</sup> , Leuc <sup>1</sup> )			B29 (Coag <sup>1</sup> , $\alpha$ Tox <sup>-</sup> , DNase <sup>1</sup> , Leuc <sup>1</sup> )		
DOSIS	M2	M14	DOSIS	M2	M14	DOSIS	M2	M14	DOSIS	M2	M14
$3,3 \cdot 10^{8+}$	85 (ns)	95 (ns)				$7,0 \cdot 10^{8+}$	0 (P<0,001)	5 (P<0,001)	$1,0 \cdot 10^9$	85	95
						$2,3 \cdot 10^{8+}$	0 (P<0,001)	0 (P<0,001)	$3,7 \cdot 10^{8+}$	5 (P<0,001)	10 (P<0,001)
$1,7 \cdot 10^{8+}$	79 (ns)	89 (ns)	$9,0 \cdot 10^{7+}$	95 (ns)	95 (ns)				$1,9 \cdot 10^{8+}$	0 (P<0,001)	0 (P<0,001)
$3,0 \cdot 10^7$	0	0	$3,0 \cdot 10^7$	5	45	$7,8 \cdot 10^7$	0	0	$6,0 \cdot 10^7$	0	0
$9,8 \cdot 10^6$	0	0	$9,9 \cdot 10^6$	0	0	$1,9 \cdot 10^7$	0	0	$2,0 \cdot 10^7$	0	0
$3,3 \cdot 10^6$	0	0	$3,0 \cdot 10^6$	0	0	$6,2 \cdot 10^6$	0	0	$6,8 \cdot 10^6$	0	0
$1,1 \cdot 10^6$	0	0	$1,1 \cdot 10^6$	0	0	$1,9 \cdot 10^6$	0	0			



Bij de bepaling van het percentage nierinfecties voor verschillende doses K.V.E. bleek dat abscesvorming in de nier duidelijk zichtbaar was vanaf 48 uur na injectie. Alle muizen die na 48 uur stierven hadden één of meer puntvormige of grotere abscessen. Slechts zelden werden abscessen in andere organen gezien. Bij proefdieren die binnen 24 uur overleden, konden abscessen meestal niet worden waargenomen. Voor de periode 24 tot 48 uur werden vaak wel, maar niet altijd abscessen gezien. Bij het vaststellen van het percentage nierinfecties werd er van uitgegaan dat alle muizen die binnen 48 uur stierven nierinfecties hadden. Stam B1 (Coag<sup>1</sup>), BS36 (δTox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) en CV4 (-B,A,F) hadden voor de verschillende doses K.V.E. evenveel nierinfecties veroorzaakt als de moederstam. Stam BH5 (αTox<sup>1</sup>) werd niet onderzocht. Stam BT22 (αTox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) heeft mogelijk, in vergelijking met de moederstam, voor de dosis 1,1.10<sup>7</sup> een lager percentage nierinfecties veroorzaakt (tabel 7).

Tabel 7. Het percentage nierinfecties (% N.A.) bij de gestorven en overlevende muizen op de 14e dag na intraveneuze toediening van verschillende doses K.V.E. van moederstam en enkele mutanten.

V4		BT22 (αTox <sup>-</sup> , Leuc <sup>1</sup> )		BB16 (αTox <sup>-</sup> , δTox <sup>-</sup> DNase <sup>1</sup> , Leuc <sup>1</sup> )		B29 (Coag <sup>1</sup> , αTox <sup>-</sup> , DNase <sup>1</sup> , Leuc <sup>1</sup> )	
DOSIS	% N.A.	DOSIS	% N.A.	DOSIS	% N.A.	DOSIS	% N.A.
				7,0.10 <sup>8</sup>	89	1,0.10 <sup>9</sup>	100
3,1.10 <sup>8</sup>	100	3,8.10 <sup>8</sup>	100			3,7.10 <sup>8</sup>	87
1,0.10 <sup>8</sup>	100	1,0.10 <sup>8</sup>	90	2,3.10 <sup>8</sup>	86	1,9.10 <sup>8</sup>	95
3,5.10 <sup>7</sup>	100	3,4.10 <sup>7</sup>	80	7,8.10 <sup>7</sup>	50	6,0.10 <sup>7</sup>	83
1,2.10 <sup>7</sup>	85	1,1.10 <sup>7</sup>	50	1,9.10 <sup>7</sup>	50	2,0.10 <sup>7</sup>	45
3,9.10 <sup>6</sup>	53	3,8.10 <sup>6</sup>	50	6,2.10 <sup>6</sup>	85	6,8.10 <sup>7</sup>	45
1,3.10 <sup>6</sup>	50	1,3.10 <sup>6</sup>	40	1,9.10 <sup>6</sup>	50		

Het verschil werd statistisch niet getoetst omdat het macroscopisch bepalen van nierinfecties niet betrouwbaar genoeg werd geacht. Wel lijkt het belangrijk vast te stellen dat de stammen BB16 en B29 die beide in vitro een lagere groeisnelheid hebben dan de moederstam, nog wel degelijk virulent zijn voor de muis. Het percentage nierinfecties is, alhoewel het in vergelijking met stam V4 lager lijkt, nog aanzienlijk.

De resultaten van deze experimenten kunnen als volgt worden geïnterpreteerd. In vergelijking met de moederstam geven de mutanten BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>), BT22( $\alpha$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) en BS36( $\delta$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) een lagere sterfte na 2 dagen wanneer vergelijkbare doses variërend van  $10^8$  tot  $4,4 \cdot 10^8$  intraveneus worden toegediend. Op één uitzondering na (BH5) is ook de sterfte na 14 dagen lager. Stam BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>) verschilt alleen van de moederstam door een verminderde  $\alpha$ -toxine productie, zodat het aannemelijk is het verschil in sterfte hieraan toe te schrijven. Stam BT22( $\alpha$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) en BS36( $\delta$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) produceren in vitro ook minder leucocidine. Men bedenke echter dat leucocidine niet toxisch is voor leucocyten en macrofagen van de muis. Bovendien verschilt stam CV4(-B,A,F), die eveneens weinig leucocidine maakt, in deze proefopstelling niet van de moederstam. Het lijkt daarom aannemelijk het verlies van  $\alpha$ - en  $\delta$ -toxine bij de stammen BT22( $\alpha$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) en BS36( $\delta$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) voor de lagere sterfte verantwoordelijk te stellen.

De stammen BB16( $\alpha$ Tox<sup>-</sup>,  $\delta$ Tox<sup>-</sup>, DNase<sup>1</sup>, Leuc<sup>1</sup>) en B29(Coag<sup>1</sup>,  $\alpha$ Tox<sup>-</sup>, DNase<sup>1</sup>, Leuc<sup>1</sup>) die in vitro een lagere groeisnelheid dan stam V4 hebben, gaven zoals kon worden verwacht een lagere sterfte dan de moederstam. Het percentage nierabscessen, alhoewel lager dan bij de muizen die met stam V4 waren ingespoten, was nog aanzienlijk. Deze waarneming zou een argument kunnen zijn voor de veronderstelling dat multiple factoren de virulentie van S. aureus bepalen.

BEPALING VAN HET AANTAL K.V.E. IN DE NIEREN BIJ MUIZEN 24 UUR NA INTRAVENEUZE INJECTIE VAN ONGEVEER  $10^8$  K.V.E. VAN MOEDERSTAM EN ENKELE MUTANTEN.

Het verschil in sterfte tussen de verliesmutanten voor  $\alpha$ - en  $\delta$ -toxine kan worden veroorzaakt door de verminderde of afwezige productie van een toxine dat letale activiteit heeft. Een tweede mogelijkheid zou kunnen zijn dat  $\alpha$ - en  $\delta$ -toxine ook nog de groei van S. aureus in de nieren van muizen bevorderen. Deze hypothese werd getoetst door het aantal K.V.E. in de nieren 24 uur na intraveneuze injectie van  $10^8$  K.V.E. van moederstam en de mutanten BH5( $\alpha\text{Tox}^1$ ), BT22( $\alpha\text{Tox}^-$ , Leuc<sup>1</sup>) en BS36( $\delta\text{Tox}^-$ , Leuc<sup>1</sup>) te vergelijken.

Groepen van 20 muizen werden met 2 doses ingespoten. De groep muizen die een dosis had gekregen die het meest nabij  $10^8$  K.V.E. lag, werd voor het experiment uitgekozen. De muizen werden na 24 uur geseceerd en het aantal K.V.E. in de nieren werd bepaald. Muizen die binnen 24 uur stierven werden na hoogstens één uur geseceerd. Bovendien werden nog 5 muizen met stam V4 ingespoten bij wie na 30 minuten het aantal K.V.E. in de nieren werd bepaald.

Het aantal K.V.E. in de nieren van de 5 muizen 30 minuten na intraveneuze injectie van  $9,0 \cdot 10^7$  K.V.E. van stam V4 bedroeg:  $1,7 \cdot 10^5$ ;  $4,1 \cdot 10^5$ ;  $3,6 \cdot 10^5$ ;  $2,2 \cdot 10^5$  en  $1,1 \cdot 10^5$ . Na 24 uur werden hogere aantallen gevonden (tabel 8). Uit tabel 8 blijkt dat de stammen BH5( $\alpha\text{Tox}^1$ ) en BT22( $\alpha\text{Tox}^-$ , Leuc<sup>1</sup>) onder bovengenoemde omstandigheden een lager aantal K.V.E. in de nieren veroorzaken dan de moederstam. Aangezien stam BS36( $\delta\text{Tox}^-$ , Leuc<sup>1</sup>) niet van de moederstam verschilde, werd het experiment herhaald. In tabel 9 is te zien dat deze stam wederom niet verschilt van stam V4.

Uit deze experimenten kan worden geconcludeerd dat  $\alpha$ -toxine verliesmutanten zich minder snel vermenigvuldigen in de nieren van muizen maar dat dit niet geldt voor een  $\delta$ -toxine verliesmutant. De oorzaak hiervan kan zijn dat  $\alpha$ -toxine de natuurlijke afweer belemmert.

Tabel 8. Uiterste waarden (R) en mediaan (M) van het aantal K.V.E. in de nieren van groepen van 20 muizen die intraveneus werden ingespoten met de stammen V4, BH5( $\alpha\text{Tox}^1$ ), BT22( $\alpha\text{Tox}^-$ , Leuc $^1$ ) en BS36( $\delta\text{Tox}^-$ , Leuc $^1$ ).

STAM	DOSIS	R	M	VERSCHIL MET STAM V4 TWEE-ZIJDIG GETOETST VOLGENS WILCOXON.
V4	$9,0 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^6 - 2,6 \cdot 10^8$	$2,8 \cdot 10^7$	
BH5( $\alpha\text{Tox}^1$ )	$1,1 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^4 - 5,4 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^5$	$P < 0,001$
BT22( $\alpha\text{Tox}^-$ , Leuc $^1$ )	$1,8 \cdot 10^8$	$6,5 \cdot 10^5 - 4,8 \cdot 10^8$	$6,5 \cdot 10^6$	$P < 0,01$
BS36( $\delta\text{Tox}^-$ , Leuc $^1$ )	$1,6 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^7 - 4,9 \cdot 10^8$	$3,7 \cdot 10^7$	geen verschil

Tabel 9. Uiterste waarden (R) en mediaan (M) van het aantal K.V.E. in de nieren van groepen van 20 muizen die intraveneus werden ingespoten met de stammen V4 en BS36( $\delta\text{Tox}^-$ , Leuc $^1$ ).

STAM	DOSIS	R	M	VERSCHIL MET STAM V4 GETOETST VOLGENS WILCOXON
V4	$1,6 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^5 - 4,6 \cdot 10^8$	$3,9 \cdot 10^7$	
BS36( $\delta\text{Tox}^-$ , Leuc $^1$ )	$1,8 \cdot 10^8$	$5,0 \cdot 10^5 - 3,4 \cdot 10^8$	$4,6 \cdot 10^7$	geen verschil

#### VERGELIJKING VAN HET AANTAL K.V.E. IN DE NIEREN VAN KONIJNEN NA INTRAVENEUZE INJECTIE VAN MOEDERSTAM EN DE MUTANT L62(Leuc $^1$ ).

Een oriënterend onderzoek naar de bijdrage van leucocidine tot de virulentie van S. aureus werd gedaan door 2 groepen van drie konijnen intraveneus in te spuiten met ongeveer  $2 \cdot 10^8$  K.V.E. van stam V4 en de mutant L62(Leuc $^1$ ). De methodiek was hetzelfde als bij soortgelijke

proeven met muizen, doch het aantal K.V.E. werd in elke nier afzonderlijk geteld. Alle konijnen werden 24 uur na injectie ziek. Na 48 uur werd de proef beëindigd. Eén van de konijnen was inmiddels gestorven. In tabel 10 is te zien dat het aantal K.V.E. in de nieren van konijnen na intraveneuze injectie van bovengenoemde stammen in een dosis van ongeveer  $2 \cdot 10^8$  niet verschilt. Om deze reden werd van verder onderzoek naar de betekenis van dit toxine afgezien.

Tabel 10. Aantal K.V.E. in rechter en linker nier 48 uur na intraveneuze injectie van stam V4 en L62(Leuc<sup>1</sup>) in 2 groepen van 3 konijnen.

<u>STAM V4      DOSIS <math>2,1 \cdot 10^8</math></u>		<u>STAM L62(Leuc<sup>1</sup>)      DOSIS <math>1,9 \cdot 10^8</math></u>	
<u>AANTAL K.V.E. IN:</u>		<u>AANTAL K.V.E. IN:</u>	
<u>Re nier</u>	<u>Li nier</u>	<u>Re nier</u>	<u>Li nier</u>
$6,5 \cdot 10^8$	$5,6 \cdot 10^8$	$6,6 \cdot 10^8$	$6,4 \cdot 10^8$
$4,6 \cdot 10^8$ <sup>x</sup>	$4,4 \cdot 10^8$ <sup>x</sup>	$2,8 \cdot 10^8$	$3,2 \cdot 10^8$
$4,9 \cdot 10^9$	$2,9 \cdot 10^8$	$1,7 \cdot 10^8$	$4,0 \cdot 10^8$

x konijn gestorven na 24 uur

#### CONCLUSIE.

Verliesmutanten voor  $\alpha$ - en  $\delta$ -toxine geven een lagere sterfte bij muizen wanneer ze in een dosis variërend van  $10^8$  tot  $4,4 \cdot 10^8$  worden ingespoten. Stam B1(Coag<sup>1</sup>) en CV4(-B,A,F), die stafylokinase<sup>-</sup> is en minder leucocidine maakt, verschillen in dit opzicht niet van de moederstam. Het verschil in sterfte-percentages kan worden toegeschreven aan de verminderde of afwezige productie van  $\alpha$ - of  $\delta$ -toxine. Voor  $\alpha$ -toxine werd bovendien aannemelijk gemaakt dat het de groei van

S. aureus in de nieren van muizen bevordert.  $\delta$ -Toxine heeft dit effect niet want ondanks een verschil in sterfte ten opzichte van de moederstam werd bij herhaling hetzelfde aantal K.V.E. in de nieren gevonden. Stam L62(Leuc<sup>1</sup>) werd met de moederstam vergeleken door bij konijnen het aantal K.V.E. in beide nieren afzonderlijk 48 uur na intraveneuze injectie te bepalen. Een verschil werd niet gevonden.

C. HET EFFECT VAN SUBCUTANE INJECTIE VAN S. AUREUS EN S. EPIDERMIDIS BIJ MUIZEN DIE EEN TOTALE LICHAAMSBESTRALING MET RONTGENSTRALEN HEBBEN ONDERGAAN.

Een onderzoek naar de gevoeligheid voor stafylokokken-infecties van de huid bij muizen bij wie de algemene weerstand door een totale lichaamsbestraling was verzwakt, werd ondernomen om te zien of deze proefopstelling een bruikbaar experimenteel model zou kunnen geven voor het onderzoek naar virulentieverschillen. Dit model was mede geïnspireerd door de klinische ervaring bij de mens bij wie ernstige stafylokokken-infecties relatief vaak optreden wanneer de algemene weerstand is verzwakt (Cluff en medewerkers, 1968).

Bij een dosis van ongeveer 800 Röntgen (R) verdwijnen na 3 dagen vrijwel alle leucocyten uit bloed en beenmerg. Een spontane sterfte door endogene infecties kan worden verwacht vanaf de 10e dag na de bestraling (persoonlijke mededeling Prof. Dr. F. Wensinck).

HET EFFECT VAN EEN LAGE SUBCUTANE DOSIS K.V.E. VAN STAM V4 BIJ MUIZEN DIE MET VERSCHILLENDE DOSES RONTGENSTRALEN ZIJN BESTRAALD.

Groepen van 12 muizen werd bestraald met 100, 200, 400 en 500 R en na 3 dagen werd stam V4 in een dosis van  $7,1 \cdot 10^2$  K.V.E. subcutaan ingespoten. Spontane sterfte werd niet waargenomen. In de twee groepen muizen die de laagste bestralingsdosis hadden gehad, kregen 3 van de 12 muizen huidlesies. In de twee andere groepen waren het er elk 4. Alle lesies hadden een score van 1 (zie voor lesiescore pagina 22) Alle lesies genazen in de loop van 14 dagen spontaan. Vervolgens werd

het experiment herhaald met muizen die een hogere dosis röntgenstralen hadden gehad. In tabel 11 zijn de resultaten van dit experiment weer-

Tabel 11. Cumulatieve sterfte (absolute aantallen) en gemiddelde lesiescore (weergegeven door het getal tussen haakjes) bij groepen van 12 muizen die 3 dagen na een totale lichaamsbestraling variërend van 600 tot 800 Röntgen (R) met  $1,3 \cdot 10^3$  K.V.E. van stam V4 subcutaan werden ingespoten.

GROEP MUIZEN BESTRAALD MET	CUMULATIEVE STERFTE EN GEMIDDELDE LESIESCORE NA DAG <sup>x</sup>				
	1	2	4	6	12
800 R	0(1,0)	0(1,0)	10(2,0)	12(2,0)	12
750 R	0(1,0)	1(1,0)	10(2,0)	12(2,0)	12
700 R	0(0)	0(1,0)	8(1,8)	10(1,8)	11
650 R	0(0)	0(1,0)	3(1,6)	6(1,6)	9
600 R	0(0)	0(0)	0(1,5)	2(1,5)	4
800 R (C <sup>+</sup> )	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	12
600 R (C <sup>+</sup> )	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0

x dagen gerekend vanaf de subcutane injectie

+ muizen van de controlegroep (C) werden ingespoten met 0,9% NaCl

gegeven. Alle muizen die een stralingsdosis van 750 of 800 R hadden gekregen en met stam V4 waren ingespoten, kregen zeer grote necrotiserende huidlesies, waaraan ze stierven. Het aantal muizen dat binnen 6 dagen na subcutane injectie stierf was afhankelijk van de stralingsdosis. De muizen van de controlegroep die met 800 R waren bestraald, werden ziek vanaf dag 7 (dag 10 vanaf de bestraling) en stierven alle binnen 4 dagen. Van de 12e tot de 21e dag werden sterfgevallen niet meer waargenomen zodat het experiment werd beëindigd. De muizen stierven onder het beeld van een toxemie met evenwichtsstoornissen en paralyse van de achterpoten. Bij drie muizen die een stralingsdosis

van 800 R hadden gekregen, werd het aantal K.V.E. in de huidlesie bepaald en dit bedroeg respectievelijk  $1,4 \cdot 10^9$ ,  $1,8 \cdot 10^9$  en  $4,0 \cdot 10^{10}$  K.V.E. In een vergelijkbaar experiment werden bovendien nog 5 muizen die na een bestraling met 800 R subcutaan werden besmet met  $1,2 \cdot 10^2$  K.V.E. van stam V4 kort voor overlijden afgemaakt. Bloedkweken waren steriel bij drie muizen, bij twee muizen werd slechts geringe groei van S. aureus gevonden. Het lijkt aannemelijk dat de muizen overlijden aan toxemie ten gevolge van enorme vermeerdering in de huid van het oorspronkelijke inoculum.

#### ONDERZOEK NAAR VIRULENTIEVERSCHILLEN TUSSEN MOEDERSTAM EN EEN AANTAL MUTANTEN NA SUBCUTANE INJECTIE VAN MINDER DAN 100 K.V.E. BIJ MUIZEN DIE EEN TOTALE LICHAAMSBESTRALING HEBBEN ONDERGAAN.

In een inleidend experiment werd aangetoond dat subcutane injectie van slechts 10 K.V.E. van stam V4 letale necrotische lesies veroorzaakte bij muizen die met 800 R waren bestraald.

De mutanten BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>), BS36( $\delta$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>), B1(Coag<sup>1</sup>), BF34(Kin<sup>-</sup>) en L62(Leuc<sup>1</sup>) werden nu met de moederstam vergeleken door een dosis van minder dan 100 K.V.E. subcutaan in te spuiten bij groepjes van 10 muizen die drie dagen tevoren met 800 R waren bestraald. In tabel 12 is de cumulatieve sterfte en de gemiddelde lesiescore in de tijd weergegeven. Hieruit blijkt dat de sterfte van de muizen die met moederstam of mutanten werden geïnjecteerd niet verschilt. Het enige verschil dat werd opgemerkt was dat de lesies bij stam BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>) één dag later ontstonden. Deze stam die na subcutane injectie in normale muizen nimmer necrose veroorzaakte, gaf nu wel necrotische lesies. Blijkbaar treedt er onder deze proefomstandigheden een dusdanige multiplicering van bacteriën op dat een geringe  $\alpha$ -toxineproductie of alleen al de productie van  $\delta$ -toxine voldoende is voor necrose van de huid.

De resultaten van deze experimenten kunnen als het volgt worden geïnterpreteerd. Het lijkt aannemelijk dat muizen die een letale dosis röntgenstralen hebben gehad hun weerstand voor S. aureus vrijwel geheel verloren hebben. Waarschijnlijk zijn kleine virulen-



Tabel 12. Vergelijking van de cumulatieve sterfte (absolute aantallen) en gemiddelde lesiescore (weergegeven door het getal tussen haakjes) bij groepen van 10 muizen die 3 dagen na een totale lichaamsbestraling van 800 R in een vergelijkbare dosis K.V.E. subcutaan werden ingespoten met de moederstam en enkele mutanten.

MUIZEN INGESPOTEN MET:	DOSIS IN K.V.E.	CUMULATIEVE STERFTE EN GEMIDDELDE LESIE- SCORE NA DAG <sup>x</sup> :							
		<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>6</u>	<u>8</u>	<u>11</u>	
V4	34	0(0)	0(1,3)	0(1,6)	2(1,8)	8(2,0)	10	10	
BH5( $\alpha$ Tox <sup>1</sup> )	57	0(0)	0(0)	1(1,2)	4(1,8)	9(1,8)	10	10	
BS36( $\delta$ Tox <sup>-</sup> , Leuc <sup>1</sup> )	18	0(0)	0(0,7)	1(1,6)	2(1,6)	8(1,6)	10	10	
B1(Coag <sup>1</sup> )	55	0(0)	0(1,6)	0(2,0)	4(2,0)	10(2,0)	10	10	
BF34(Kin <sup>-</sup> )	30	0(0)	0(0,7)	0(1,6)	5(1,8)	10(2,0)	10	10	
L62(Leuc <sup>1</sup> )	54	0(0)	0(1,6)	1(1,6)	4(1,6)	8(1,6)	10	10	
0,9% NaCl	-	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1	10	

x dagen gerekend vanaf de subcutane injectie

tieverschillen zoals in voorgaande experimenten is aangetoond voor de stammen BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>) en BS36( $\delta$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) ten opzichte van stam V4 niet van betekenis wanneer de weerstand van de gastheer ernstig is verzwakt.

#### HET EFFECT VAN SUBCUTANE INJECTIE VAN STAM WOOD 46 EN EEN S. EPIDERMIDIS IN MUIZEN DIE EEN TOTALE LICHAAMSBESTRALING HEBBEN ONDERGAAN.

In het licht van de voorgaande experimenten werd het effect van subcutane injectie van de S. aureus stam Wood 46, waarvan bekend is dat hij weinig virulent voor de muis is (Hill, 1968; zie ook pagina 22 van dit proefschrift) en een S. epidermidis (S2020), die werd geïsoleerd van een Spitz-Holter klep, in de bestraalde muis met stam V4 vergeleken. Groepen van 20 muizen werden met 725 R bestraald en na 3 dagen subcutaan geïnjecteerd. Stam Wood 46 veroorzaakte grote necro-

tiserende lesies. De lesiescore in het tijdsverloop van 0 tot 14 dagen was voor stam Wood 46 en V4 niet verschillend. Wel bleek dat Wood 46 minder virulent was dan stam V4, zoals blijkt uit tabel 13 waar de

Tabel 13. Vergelijking van de cumulatieve sterfte (absolute aantallen) bij groepen van 20 muizen die 3 dagen na een totale lichaamsbestraling van 725 R subcutaan werden ingespoten met stam V4, Wood 46 en S. epidermidis S2020.

MUIZEN INGESPOTEN MET:	DOSIS IN K.V.E.	CUMULATIEVE STERFTE NA DAG <sup>x</sup> :							
		2	3	4	5	6	7	8	12
V4	1,4.10 <sup>3</sup>	0	6	10	15	16	17	17	20
Wood 46	1,7.10 <sup>3</sup>	0	0	2	2	5	8	16	16
S2020	7,1.10 <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	0	0	1
Fys. zout		0	0	0	0	0	1	1	3

x dagen gerekend vanaf de subcutane injectie

sterfte van de muizen is weergegeven. Het aantal gestorven muizen in de eerste week na injectie van stam Wood 46 is lager dan na injectie van stam V4 (chi-kwadraat toets op dag 5 en 6:  $P < 0,001$ ).

S. epidermidis blijkt onder deze proefomstandigheden niet pathogeen voor de muis te zijn. Lesies werden niet gezien en de sterfte onder de muizen verschilde niet van de controlegroep (tabel 13). Dit was eveneens het geval wanneer hetzelfde experiment werd herhaald met een hogere dosis namelijk  $1,8 \cdot 10^4$  K.V.E.

#### CONCLUSIE.

Muizen die een letale lichaamsbestraling met Röntgenstralen hebben ondergaan zijn bijzonder gevoelig voor huidinfecties door S. aureus. Onder deze omstandigheden hebben muizen hun weerstand tegen S. aureus

blijkbaar geheel verloren aangezien een zeer lage subcutane dosis K.V.E. voldoende is om muizen te doen sterven. Twee mutanten BH( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>) en BS36( $\delta$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) bij wie in een andere proefopstelling een klein verschil in virulentie ten opzichte van de moederstam was vastgesteld, verschilden in deze proefopstelling niet wezenlijk van de moederstam. Wel bleek er een verschil te bestaan in het tijdstip van de dood wanneer bestraalde muizen met stam V4 en de minder virulente stam Wood 46 subcutaan werden ingespoten. Het virulentieverschil tussen deze stammen is echter al aantoonbaar bij subcutane injectie bij niet bestraalde muizen. Een S. epidermidis stam bleek zelfs onder deze proefomstandigheden niet pathogeen te zijn.

Uit de resultaten van deze experimenten kan worden geconcludeerd dat de algemene weerstand van de gastheer van grote betekenis is. Onder het voorbehoud dat conclusies uit dierproeven niet hoeven te gelden voor de mens, lijkt het waarschijnlijk dat bij patiënten met verminderde weerstand kleine verschillen in virulentie niet van betekenis zijn. In tegenstelling tot S. epidermidis moet elke S. aureus onder dergelijke omstandigheden als virulent worden beschouwd.

#### BESPREKING EN CONCLUSIE.

Doelstelling van dit onderzoek was de betekenis van een aantal producten van S. aureus voor de pathogeniteit en virulentie te onderzoeken. Uit de in dit hoofdstuk beschreven experimenten werden de volgende conclusies getrokken.

1. Dermonecrose bij huidinfecties wordt veroorzaakt door de productie van  $\alpha$ - en  $\delta$ -toxine.

Injectie van kleine hoeveelheden  $\alpha$ -toxine in de huid geeft dermonecrose bij een groot aantal proefdieren. De necrose van de huid die optreedt bij huidlesies ten gevolge van S. aureus infecties moet waarschijnlijk worden toegeschreven aan  $\alpha$ -toxineproductie maar het strikte bewijs hiervan werd niet geleverd (Noble, 1965; McClatchy en Rosenblum, 1966). Het feit dat huidlesies door  $\alpha$ -toxine verlies-

mutanten in tegenstelling tot de moederstam nimmer necrose tonen, bewijst dat  $\alpha$ -toxineproductie noodzakelijk is voor de vorming van necrose bij huidinfecties door S. aureus.

Injectie van een ruw  $\delta$ -toxinepreparaat in de huid geeft in vergelijking met  $\alpha$ -toxine matig ernstige necrose (Marks en Vaughan, 1950). Over de activiteit van dit toxine tijdens infecties is echter niets bekend. Aangezien een  $\delta$ -toxine verliesmutant, die evenveel  $\alpha$ -toxine als de moederstam maakt, in tegenstelling tot de moederstam alleen in een hoge dosis necrose veroorzaakt, kan worden geconcludeerd dat ook dit toxine in vivo bijdraagt tot het ontstaan van necrose bij huidinfecties door S. aureus.

2. De sterfte van muizen wordt onder bepaalde proefomstandigheden beïnvloed door productie van  $\alpha$ - en  $\delta$ -toxine.

Kapral (1965) toonde reeds aan dat voor de intraperitoneale besmettingsweg de LD50 van een  $\alpha$ -toxine verliesmutant groter was dan die van de moederstam. De letale activiteit van  $\alpha$ -toxine kon worden bevestigd voor de intraveneuze besmettingsweg.

Over de letale activiteit van  $\delta$ -toxine tijdens infecties is niets bekend. Aangezien de sterfte van muizen na intraveneuze injectie van een bepaalde dosis K.V.E. van een verliesmutant voor  $\delta$ -toxine, in vergelijking met de moederstam lager is, kan worden geconcludeerd dat ook  $\delta$ -toxine in vivo letale activiteit heeft.

3.  $\alpha$ -Toxine verliesmutanten vermenigvuldigen zich onder bepaalde omstandigheden in vivo minder snel dan de moederstam, hetgeen niet eerder was beschreven. Dit zou kunnen betekenen dat  $\alpha$ -toxine agressieve activiteit heeft. Dit verschijnsel was voor de  $\delta$ -toxine verliesmutant niet aantoonbaar.

De letale en voornoemde hypothetische agressieve activiteit van  $\alpha$ -toxine waren experimenteel echter niet van elkaar te scheiden.

4. Voor het vrije coagulase, P-V leucocidine en stafylokinase kon niet worden aangetoond dat ze enige betekenis hebben voor de pathogeniteit en virulentie van S. aureus.

5. De algemene betekenis van de extracellulaire producten als virulentie-

factor bij infecties door S. aureus is vermoedelijk gering.

Dit lijkt zeker het geval te zijn als de algemene weerstand van de gastheer is verzwakt zoals werd aangetoond bij muizen die een totale lichaamsbestraling hebben ondergaan.

Bovengenoemde conclusies gelden slechts voor de proefomstandigheden die werden gekozen. Onder dit voorbehoud lijkt het waarschijnlijk dat de pathogeniteit van S. aureus wordt bepaald door multiële factoren, die ieder op zich niet van wezenlijke betekenis zijn. Een uitzondering hierop is misschien een in de celwand gelocaliseerd agressine. In hoofdstuk 5 zal hierop nader worden ingegaan.

## Hoofdstuk 5

### DE BETEKENIS VAN HET IN DE CELWAND VAN VIRULENTE S. AUREUS STAMMEN GELOCALISEERDE AGRESSINE

#### I N L E I D I N G

In de celwand van virulente S. aureus stammen bevindt zich een factor die leucocytenmigratie en oedeemvorming ter plaatse van het inoculum tegengaat (zie ook pagina 4 en 5).

Dit agressine kan met desoxycholzuur uit de celwanden van jonge culturen worden geextraheerd (Hill, 1968). Het op deze wijze verkregen desoxycholaat-residu (D.O.C.R.) heeft een lesieversterkend effect, wanneer het bij subcutane injectie van een virulente S. aureus stam aan het inoculum wordt toegevoegd.

Eerst zal worden onderzocht of stam V4 dit agressine bezit. Daarna zal worden nagegaan of een minder virulente stam zoals Wood 46, die het agressine niet bezit (Hill, 1968), virulenter wordt wanneer D.O.C.R. van een virulente stam aan het inoculum wordt toegevoegd. Tenslotte zal bij een beperkt aantal proefpersonen worden onderzocht of het agressine bij de mens een lesieversterkend effect heeft.

#### M A T E R I A A L   E N   M E T H O D E N

##### BEREIDING VAN HET D.O.C.R.

Voor de bereiding van het D.O.C.R. werd het voorschrift van Hill (1968) gevolgd. Vijf liter Nutrient Broth no. 2 (Oxoid) met 1% gistextract (Oxoid), voorverwarmd tot 37°C, werd met 250 ml 16 uur cultuur beënt. De cultuur werd 3 uur licht schuddend bebroed bij 37°C en vervolgens

gecentrifugeerd bij 4°C. Het sediment werd bij 4°C tweemaal gewassen met 0,9% NaCl en tweemaal met aqua dest., waarbij 10 minuten bij 6000 g werd gecentrifugeerd. Daarna werden celwanden gemaakt door desintegratie volgens Mickle met het trilapparaat van Braun. Het celwanden-preparaat werd vervolgens bij 4°C 10 minuten bij 6000 g gecentrifugeerd en het sediment werd weer tweemaal gewassen in 0,9% NaCl en aqua dest. Vervolgens werd het preparaat gevriesdroogd. Gedroogde celwanden werden gedurende 4 uur bij 4°C geëxtraheerd in 1% desoxycholzuur (B.H.D.) in 1N NaOH (5 mg celwandsubstantie per ml). De suspensie werd bij 4°C gecentrifugeerd bij 6000 g gedurende 30 minuten en het sediment werd weer tweemaal gewassen in 0,9% NaCl en tweemaal in aqua dest., waarna het werd gevriesdroogd. D.O.C.R.-suspensie kan in oplossing worden gebracht door een behandeling gedurende 6 uur bij 37°C met een lysozym-oplossing in fosfaatbuffer (0,01 M., pH 7,0) in een concentratie van 5 mg D.O.C.R. en 50E lysozym per ml. Het lysozym werd daarna geïnactiveerd door 10 minuten verhitting bij 100°C.

#### MUISPROEVEN.

Voor het testen van D.O.C.R. werd een D.O.C.R.-suspensie in 0,9% NaCl kortdurend gemengd met een verdunde bacteriecultuur op een Vortex apparaat. De dierproeven werden verder uitgevoerd zoals aangegeven in hoofdstuk 4.

## R E S U L T A T E N

### A. ONDERZOEK NAAR AGRESSINEACTIVITEIT VAN D.O.C.R. VAN STAM V4.

De agressineactiviteit van D.O.C.R. van stam V4 werd onderzocht door een dosis K.V.E. van stam V4 die lager was dan de minimale pusvormende

dosis ( $10^6$  K.V.E.) te mengen met een D.O.C.R.-suspensie en deze vervolgens subcutaan bij muizen in te spuiten.

In tabel 1 is te zien dat 50  $\mu$ g D.O.C.R. van stam V4 een virulentieversterkende activiteit heeft. Na behandeling met lysozym is het D.O.C.R. eveneens werkzaam.

Tabel 1. Gemiddelde lesiescore 1 en 2 dagen na subcutane injectie van verschillende doses K.V.E. van stam V4, die werden gesuspendeerd in 50  $\mu$ g D.O.C.R. dat afkomstig was van stam V4.

DOSIS K.V.E.	DOSIS D.O.C.R. IN $\mu$ g	AANTAL MUIZEN	GEMIDDELDE LESIESCORE NA DAG:	
			1	2
$4,4 \cdot 10^5$	50	4	1,0	2,0
$4,4 \cdot 10^5$	- +	4	0	1,0
$5,7 \cdot 10^4$	50	4	1,0	1,0
$5,7 \cdot 10^4$	- +	2	0	0
$5,7 \cdot 10^3$	50	2	1,0	1,0
$5,7 \cdot 10^3$	- +	2	0	0
$2,8 \cdot 10^5$	$50^\ddagger$	3	1,0	1,7
$2,8 \cdot 10^5$	- +	3	0	0

+ controle-experiment. Dosis gesuspendeerd in 0,9% NaCl zonder D.O.C.R.

$^\ddagger$  D.O.C.R. in opgeloste vorm na lysozymbehandeling.

Van de faagvrije stam CV4(-B,A,F) en de muisvirulente stam PS80 die Hill gebruikte, werden eveneens actieve D.O.C.R.-preparaten verkregen.

#### CONCLUSIE.

Stam V4 heeft in de celwand het agressine dat door Hill (1968) bij muisvirulente stammen werd aangetoond.



B. VIRULENTIEVERSTERKING VAN STAM WOOD 46 DOOR D.O.C.R. VAN STAM PS80.

Stam Wood 46 mist het in de celwand van virulente S. aureus stammen gelocaliseerde agressine (Hill, 1968). De stam is weinig virulent voor de muis (Hill, 1968; dit proefschrift, pagina 22).

Aangezien niet is aangetoond dat de verminderde virulentie van deze stam moet worden toegeschreven aan het ontbreken van het agressine, werd deze vraagstelling in twee proefopstellingen onderzocht.

Eerst werd nagegaan of stam Wood 46 virulenter voor de muis werd wanneer D.O.C.R. van stam PS80 aan een subcutane dosis werd toegevoegd. In tabel 2 zijn de resultaten van dit experiment voor ver-

Tabel 2. Gemiddelde lesiescore bij groepen van 10 muizen na subcutane injectie van stam Wood 46 gesuspenderd in D.O.C.R. afkomstig van stam PS80. Het verschil in lesiescore ten opzichte van de controlegroep werd getoetst volgens de Yates-toets.

AANTAL K.V.E.	DOSIS D.O.C.R. IN $\mu$ g.	GEMIDDELDE LESIESCORE NA DAG:	
		1	2
$2,3 \cdot 10^6$	- +	0,1	0,3
$2,3 \cdot 10^6$	150	1,1 (P<0,001)	1,1
$2,3 \cdot 10^5$	-	0	0
$2,3 \cdot 10^5$	150	1,0 (P<0,001)	1,0

+ controle-experiment. Dosis K.V.E. gesuspenderd in 0,9% NaCl zonder D.O.C.R.

schillende doses K.V.E. van stam Wood 46 weergegeven. Hieruit blijkt dat D.O.C.R. afkomstig van de virulente stam PS80 een virulentieversterkend effect heeft op een subcutane dosis K.V.E. van de minder

virulente stam Wood 46.

In de tweede proefopstelling werd de lesiescore in de tijd nagegaan bij muizen die een totale lichaamsbestraling van 725 R hadden ondergaan en na 3 dagen met stam Wood 46 subcutaan werden ingespoten. In tabel 3 zijn de resultaten van dit experiment weergegeven. Uit dit

Tabel 3. Gemiddelde lesiescore in de tijd na subcutane injectie van stam Wood 46 gesuspenderd in D.O.C.R. afkomstig van stam PS80, in groepen van 10 muizen die drie dagen tevoren een totale lichaamsbestraling van 725 R hebben ondergaan. Het verschil in lesiescore ten opzichte van de controlegroep zonder D.O.C.R. werd getoetst met de Yates-toets.

AANTAL K.V.E.	DOSIS D.O.C.R. IN $\mu$ g	GEMIDDELDE LESIESCORE NA DAG:	
		<u>1</u>	<u>2</u>
$2,3 \cdot 10^3$	- x	0,2	$1,0^+$
$2,3 \cdot 10^3$	150	$2,0 (P < 0,001)$	$2,0^{\dagger}$
0	-	0	0

x controle-experiment. Dosis K.V.E. gesuspenderd in 0,9% NaCl zonder D.O.C.R.

+ muizen kregen grote necrotiserende lesies en stierven binnen 10 dagen. De andere 5 toonden geen lesies

$\dagger$  alle muizen stierven aan grote necrotiserende lesies

experiment blijkt eveneens het virulentieversterkend effect van D.O.C.R. afkomstig van stam PS80 op stam Wood 46. Alle muizen krijgen lesies waaraan ze sterven terwijl in het controle-experiment slechts de helft van de muizen lesies krijgen die bovendien op één uitzondering na een dag later optreden.

#### CONCLUSIE

De verminderde virulentie voor de muis van stam Wood 46 is waarschijnlijk toe te schrijven aan het ontbreken van agressine in de celwand.

# C. HET LESIEVERSTERKEND EFFECT VAN D.O.C.R. VAN STAM PS80 BIJ DE MENS.

Het is niet bekend of het in de celwand van virulente S. aureus stammen aanwezige agressine bij infecties van de mens van betekenis is. Daarom werd bij 4 proefpersonen van het mannelijke geslacht onderzocht of het D.O.C.R. van stam PS80 een lesieversterkend effect heeft op een dosis K.V.E. van stam PS80 die lager was dan de minimale pusvormende dosis. Met uitzondering van proefpersoon 2 (zie tabel 4) die ongeveer 1 jaar geleden een groot absces aan de hand had gehad ten gevolge van een laboratorium-infectie met S. aureus, waren de andere proefpersonen de laatste jaren vrij van stafylokokken-infecties geweest. Het onderzoek werd als het volgt uitgevoerd. In de rechter onderarm werd een suspensie van  $3,5 \cdot 10^5$  K.V.E. en 150  $\mu$ g D.O.C.R. van stam PS80 in een volume van 0,1 ml 0,9% NaCl oppervlakkig subcutaan ingespoten. In de linker onderarm werd op dezelfde plaats dezelfde dosis K.V.E. zonder D.O.C.R. toegediend. Eryteem en infiltraat werden 24 uur en 48 uur na injectie gemeten.

Uit tabel 4 blijkt dat 24 uur na injectie bij alle proefpersonen

Tabel 4. Reacties van 4 proefpersonen op een subcutane injectie van  $3,5 \cdot 10^5$  K.V.E. van stam PS80 gesuspenseerd in 150  $\mu$ g D.O.C.R. van dezelfde stam (Re arm) en van dezelfde dosis K.V.E. zonder D.O.C.R. (li arm).

PROEFPERSOON	ERYTEEM IN CM <sup>x</sup>		INFILTRAAT IN CM <sup>x</sup>		ABSCESVORMING	
	NA 24 UUR		NA 24 UUR		NA 4 DAGEN	
	Re (D.O.C.R.)	Li _____	Re (D.O.C.R.)	Li _____	Re (D.O.C.R.)	Li _____
1	10x5	0,8x0,6	1x1 (pustel)	0	+	-
2	5x3,5	0,5x0,5	1x1	0	-	-
3	6x3	0,1x0,1	1x1 (pustel)	0	+	-
4	5x4	4,0x2,8	1x1	0	+	-

x de grootste doorsnede en de loodrecht daarop staande doorsnede werden gemeten.

in de rechter onderarm een infiltraat ontstond. Bij twee proefpersonen was in het centrum van het infiltraat een pustel te zien. Bovendien was er een groot eryteem. De linker arm had alleen een eryteem dat bij drie proefpersonen in twee richtingen kleiner was dan 1 cm. Aangezien de lesies de eerste dagen niet leken toe te nemen, werd het experiment niet beëindigd door toediening van een antibioticum. Helaas namen de lesies op de rechter arm bij drie van de vier proefpersonen vanaf de 4e dag toe en er ontstonden pijnlijke zeer grote abscessen die pas na 14 dagen waren genezen.

#### CONCLUSIE.

Het in de celwand gelocaliseerde agressine van muisvirulente S. aureus stammen is eveneens werkzaam bij de mens.

#### BESPREKING EN CONCLUSIE.

Het D.O.C.R. van de moederstam V4 heeft agressineactiviteit. De monomutanten en de mutanten die in twee eigenschappen van de moederstam verschilden, werden hierop niet onderzocht omdat het onwaarschijnlijk werd geacht dat ze in dit opzicht van de moederstam zouden verschillen. Immers de minimale pusvormende dosis van deze stammen verschildte niet van de moederstam.

In hoofdstuk 4 werd aangetoond dat mutanten die minder  $\alpha$ - of  $\delta$ -toxine produceerden een virulentieverschil ten opzichte van de moederstam toonden. Het verschil met de moederstam was slechts onder bepaalde proefomstandigheden aantoonbaar. Stam Wood 46 die het agressine niet bezit, is aanzienlijk minder virulent dan stam V4. Dit virulentieverschil is gemakkelijk aantoonbaar. Deze stam is virulenter te maken door D.O.C.R. afkomstig van een virulente stam aan het inoculum toe te voegen. Op grond van deze gegevens lijkt het waarschijnlijk dat het in de celwand gelocaliseerde agressine een grotere betekenis als virulentie-factor heeft dan de extracellulaire producten van S. aureus. Stam V4 en Wood 46 zijn niet verwant en mogen niet zonder meer met elkaar vergeleken worden. Het vinden van een variant van stam V4 die slechts van de moederstam verschilt in agressineproductie zou boven-

genoemde hypothese kunnen bewijzen. Aangezien het agressine bij de mens eveneens werkzaam is, lijkt een onderzoek naar effect van actieve immunisatie met D.O.C.R. bij patienten met chronische stafylokokken-ziekten aangewezen.

## S A M E N V A T T I N G

In dit proefschrift wordt een onderzoek beschreven dat tot doel had de bijdrage van een aantal producten van S. aureus tot de virulentie vast te stellen. Hiertoe werd in het dierexperiment een onderzoek gedaan naar virulentieverschillen tussen moederstam en een aantal geïnduceerde mutanten, die in één of slechts enkele karakteristieke eigenschappen van de moederstam verschilden.

In hoofdstuk 1 wordt een overzicht gegeven van de stafylokokken-producten die in verband worden gebracht met virulentie.

In hoofdstuk 2 worden de methoden voor het testen van eigenschappen van S. aureus beschreven. Een nieuwe plaatmethode waarmee coagulase-productie kan worden aangetoond werd ontwikkeld. Het medium bleek geschikt voor routine bacteriologisch onderzoek. Plaatmethoden die nodig waren voor het isoleren van verliesmutanten, werden op hun bruikbaarheid onderzocht door 100 S. aureus stammen op een aantal eigenschappen te onderzoeken. Vervolgens werden met ethylmethaan-sulfonaat mutaties geïnduceerd bij drie S. aureus stammen bij wie van te voren de virulentie voor de muis was vastgesteld. Inductie van stam V4 gaf bij deze inleidende experimenten voor de doelstelling bruikbare mutanten en werd daarom uitgekozen voor verdere inductie-experimenten. Er werden stabiele verliesmutanten gevonden, die zowel in één als in meer dan één eigenschap van de moederstam verschilden. Verliesmutanten voor  $\delta$ -toxine bleken altijd minder leucocidine te produceren en mutanten die alle voor S. aureus karakteristieke eigenschappen hadden verloren waren faag-resistent. Andere gepaarde fenotypische veranderingen werden niet waargenomen. De stammen B1(Coag<sup>1</sup>), BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>), B21( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>), BF34(Kin<sup>-</sup>), L62(Leuc<sup>1</sup>), BS36( $\delta$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) en BT22( $\alpha$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) werden uitgekozen om met de moederstam V4 in het dierexperiment te worden vergeleken (hoofdstuk 4). De stammen BF34(Kin<sup>-</sup>) en L62(Leuc<sup>1</sup>) toonden ten opzichte van de moederstam kleine verschillen in het faagpatroon.

In hoofdstuk 3 werd daarom onderzocht of laatstgenoemde mutanten in profaag-genotype van de moederstam verschilde. Dit werd waarschijnlijk gemaakt doordat deze stammen faaggevoelig waren voor faaglysaten die door inductie van de moederstam met mitomycine C waren verkregen. De vraagstelling of er verband bestond tussen de verandering in stafylokinase- en leucocidineproductie en een wijziging in het faag-genotype werd onderzocht door de moederstam te genezen voor alle profagen. Door de moederstam in de aanwezigheid van antifaagserum met mitomycine C te induceren werden varianten verkregen die achter-eenvolgens waren genezen van een groep B, A en F faag.

De genezen varianten werden vervolgens weer gelysogeniseerd met de zuivere B-, A- en F-faag. Vergelijking van het faagpatroon van de verkregen varianten van stam V4 en de stammen BF34(Kin<sup>-</sup>) en L62(Leuc<sup>1</sup>) maakte waarschijnlijk dat stam BF34(Kin<sup>-</sup>) genezen was van een F-faag en stam L62(Leuc<sup>1</sup>) van een A-faag.

Alle genezen en weer gelysogeniseerde varianten werden vervolgens onderzocht op een aantal eigenschappen van S. aureus. Alle stammen die waren genezen van de A-faag hadden in vergelijking met de stammen die lysogeen voor deze faag waren een zeer lage productie van leucocidine. De relatie leucocidineproductie en lysogenisatie met de groep A faag kan worden geïnterpreteerd als een lysogene conversie naar een hogere leucocidineproductie aangezien werd aangetoond dat lysogenisatie van een andere faagvrije stam (S57) altijd resulteerde in een toename van de leucocidineproductie. Alle stammen die waren genezen van de F-faag waren stafylokinase<sup>-</sup> en alle stammen die lysogeen waren voor deze faag waren stafylokinase<sup>+</sup>. Dit verschijnsel kon eveneens als een lysogene conversie worden geïnterpreteerd.

In hoofdstuk 4 werden bovengenoemde mutanten in het dierexperiment met de moederstam vergeleken. Drie experimentele modellen werden gebruikt namelijk (a) subcutane en (b) intraveneuze injectie van stafylokokken bij normale muizen en (c) subcutane injectie bij muizen die een totale lichaamsbestraling met röntgenstralen hadden ondergaan.

a) In tegenstelling tot de moederstam gaven de  $\alpha$ -toxine verliesmutanten

na subcutane injectie nooit necrose. Een  $\delta$ -toxin verliesmutant gaf alleen necrose wanneer een hoge dosis kolonievormende eenheden (K.V.E.) werd ingespoten. Hieruit kon worden geconcludeerd dat necrose bij huidinfecties door S. aureus wordt veroorzaakt door zowel  $\alpha$ - als  $\delta$ -toxine.

- b) Vervolgens werd nagegaan of het aantal K.V.E. in de nieren na intraveneuze injectie van een niet letale dosis van stam V4 en de mutant BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>) verschilde. Beide stammen vermeerderden zich in de nieren maar een significant verschil werd niet gevonden. Wel werd aangetoond dat alle mutanten die een verminderde of afwezige productie van  $\alpha$ - of  $\delta$ -toxine hadden een lagere sterfte dan de moederstam veroorzaakten wanneer een dosis variërend van  $1,0 \cdot 10^8$  tot  $4,4 \cdot 10^8$  K.V.E. intraveneus werd ingespoten. Voor de dosis van ongeveer  $1,0 \cdot 10^8$  K.V.E. (ongeveer de LD90 dosis van de moederstam) werd aangetoond dat stam BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>) en stam BT22( $\alpha$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) zich in de nieren minder snel vermenigvuldigden dan de moederstam. De  $\delta$ -toxine verliesmutant verschilde in dit opzicht niet van de moederstam. In een zelfde proefopstelling met konijnen werden verschillen tussen moederstam en mutant L62(Leuc<sup>1</sup>) niet gevonden.

Uit deze experimenten werd geconcludeerd dat productie van  $\alpha$ - en  $\delta$ -toxine onder bepaalde proefomstandigheden de sterfte van muizen vergroot wanneer ze met S. aureus worden ingespoten.  $\alpha$ -Toxine heeft in tegenstelling tot  $\delta$ -toxine onder dezelfde omstandigheden een groeibevorderend effect.

- c) Muizen die van te voren een letale lichaamsbestraling van 750-800 R hebben gehad worden zo gevoelig voor huidinfecties door S. aureus dat subcutane injectie van 100 K.V.E. van zowel moederstam als alle mutanten huidlesies gaven waaraan ze stierven. Een niet aan V4 verwante stam Wood 46 die een in de celwand gelocaliseerd agressine mist was in de bestraalde muis minder virulent.

De verliesmutanten B1(Coag<sup>1</sup>), BF34(Kin<sup>-</sup>) en L62(Leuc<sup>1</sup>) verschilden in de drie bovengenoemde experimentele modellen niet van de moederstam.

In hoofdstuk 5 werd een onderzoek gedaan naar de betekenis van een in



de celwand gelocaliseerd agressine. In het residu van een desoxycholaat-extract (D.O.C.R.) van de celwanden van stam V4 en de muisvirulente stam PS80 kon agressineactiviteit worden aangetoond. Het D.O.C.R. van stam PS80 heeft een virulentieversterkend effect op stam Wood 46. Bij 4 proefpersonen kon worden aangetoond dat dit D.O.C.R. bij de mens een virulentieversterkende factor is.

## S U M M A R Y

In this thesis the contribution of a number of staphylococcal products to virulence of Staphylococcus aureus has been investigated. The basic approach was to obtain mutants by induction and to use only those which had lost one or very few characteristics and to compare their virulence with that of the wild type.

In chapter 1 a survey is given of those staphylococcal products which may be related to virulence.

The methods used for testing the properties of S. aureus are described in chapter 2. Coagulase production was detected by using a new solid medium which was developed during the course of this investigation. The usefulness of this medium for routine bacteriology was also demonstrated. With this and other solid media used for the isolation of mutants the properties of 100 strains of S. aureus were investigated. Mutants were induced by treating three mouse virulent strains with ethyl methanesulfonate. In preliminary experiments strain V4 yielded a number of useful mutants and it was, therefore, chosen as the wild type for further induction experiments. Stable mutants were isolated which differed in one or more characteristics from the wild type. Loss of  $\delta$ -toxin production was invariably associated with decreased production of leucocidin and mutants which had lost all characteristics of S. aureus were phage resistant. Other paired phenotypic changes were not observed. The strains B1(Coag<sup>1</sup>), BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>), B21( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>), BF34(Kin<sup>-</sup>), L62(Leuc<sup>1</sup>), BS36( $\delta$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) and BT22( $\alpha$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) were selected for comparison with the wild type in animal experiments (chapter 4). The phage-typing pattern of strain BF34(Kin<sup>-</sup>) and L62(Leuc<sup>1</sup>) was slightly different from the pattern of the wild type. These strains were therefore investigated with the object of determining whether or not the prophage genotype differed from the wild type.

The results of these studies are reported in chapter 3. Strains BF34(Kin<sup>-</sup>) and L62(Leuc<sup>1</sup>) were found to be sensitive to phage lysates obtained by induction of the wild type with mitomycin C. This observation strongly suggests that prophage genotype of the mutants and wild type are different. Possible relationships between loss of staphylokinase and leucocidin production and changes in prophage genotype were studied by curing the wild type of all prophages. Curing was achieved by successive elimination of a group B, A and F phage. The cured variants of strain V4 were lysogenised with pure group B, A and F phage. Comparison of the phage-typing pattern of the lysogenic and non-lysogenic variants showed that strain BF34(Kin<sup>-</sup>) was cured of a group F phage and strain L62(Leuc<sup>1</sup>) of a group A phage. All lysogenic and non-lysogenic variants were tested for a number of characteristics for S. aureus. All strains cured of the group A phage showed a considerable loss of leucocidin production. The capacity to form this toxin was restored after lysogenisation with the group A phage. The relationship between leucocidin production and lysogenisation with a group A phage can be interpreted as a lysogenic conversion to a higher leucocidin production because lysogenisation of a phage-free strain S57 always resulted in a higher leucocidin production. A second lysogenic conversion was also demonstrated; all strains cured of group F phage were staphylokinase<sup>-</sup> and all strains which were lysogenic for this phage were staphylokinase<sup>+</sup>.

In chapter 4 the results are described of animal experiments in which the mutants mentioned above and the wild type were compared. Three models were used for these experiments namely (a) subcutaneous and (b) intravenous injection of staphylococci in normal mice and (c) subcutaneous injection in mice after total body X-ray irradiation

a) In contrast to the wild type, mutants deficient in or lacking  $\alpha$ -toxin production never produced necrosis after subcutaneous injection. A mutant deficient in  $\delta$ -toxin production only produced necrosis when a high dose of colony forming units (c.f.u.) was

injected. From these experiments it was concluded that necrosis following dermal infection by S. aureus is caused by  $\alpha$ -toxin and  $\delta$ -toxin production.

- b) It was demonstrated that the wild type and mutant BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>) multiplied in the kidneys after intravenous injection of a non-lethal dose K.V.E. The number of K.V.E. in the kidneys did not differ significantly. However, after intravenous injection of  $1.0 \times 10^8$  to  $4.4 \times 10^8$  c.f.u. of any mutant in which  $\alpha$ - or  $\delta$ -toxin production was either decreased or absent, the mortality as compared with the wild type was lowered. Using a dose of about  $1.0 \times 10^8$  c.f.u. which is approximately the LD90 dose of the wild type for mice, it was shown that BH5( $\alpha$ Tox<sup>1</sup>) and strain BT22 ( $\alpha$ Tox<sup>-</sup>, Leuc<sup>1</sup>) multiplied less rapidly in the kidneys than did the wild type. However, the mutant which had lost the ability to produce  $\delta$ -toxin did not differ in this respect from the wild type. In rabbits no differences were found using similar experimental models, between the wild type and the mutant L62(Leuc<sup>1</sup>). From these experiments it was concluded that under given circumstances the production of  $\alpha$ - and  $\delta$ -toxin may increase the mortality of mice which are injected with S. aureus. Under similar experimental conditions  $\alpha$ -toxin, in contrast to  $\delta$ -toxin, has a growth enhancing effect.
- c) After total body irradiation with 750-800 R, mice became highly sensitive to skin infections by S. aureus. Subcutaneous injection of doses as low as 100 c.f.u. of the wild type and of all mutants resulted in lesions followed by death. Strain Wood 46, however, which is not related to strain V4 and lacks aggressin in the cell wall, was less virulent for irradiated mice.

In the three experimental models described above no difference was found between the wild type and the mutants B1(Coag<sup>1</sup>), BF34(Kin<sup>-</sup>) and L62(Leuc<sup>1</sup>).

In chapter 5 the investigation of the significance of an aggressin localised in the cell wall is reported. In the residue of the desoxycholate extract (D.O.C.R.) of the cell walls of strain V4 and

the mouse virulent strain PS80 aggressin like activity was demonstrated. The D.O.C.R. of strain PS80 has a virulence enhancing effect on strain Wood 46. It was shown in 4 volunteers that this D.O.C.R. has a virulence enhancing effect in man.

# L I T E R A T U U R

- Abramson, C. en H. Friedman (1967). J. Inf. Dis., 117, 242.
- Adlam, C., J.H. Pearce en H. Smith (1968). Nature (London), 219, 641.
- Agarwal, D.S. (1967a). Br. J. Exp. Path., 48, 436.
- Agarwal, D.S. (1967b). Br. J. Exp. Path., 48, 468.
- Agarwal, D.S. (1967c). Br. J. Exp. Path., 48, 483.
- Arbuthnott, J.P. (1970). Staphylococcal  $\alpha$ -toxine. Microbial toxins, volume III. Academic Press, New York and London.
- Arbuthnott, J.P., J. Kent, A. Lyell en C.G. Gemmel (1972). Br. J. Derm., 86, suppl. 8, 35.
- Asheshov, E.H. en K.C. Winkler (1966). Nature (London), 209, 638.
- Asheshov, E.H. (1967). Progress in microbiological technics. Butterworth, London.
- Baird-Parker, A.C. (1963). J. Gen. Microbiol., 30, 409.
- Bänffer, J.R.J. (1961). Anti-leucocidine bij staphylococcen-infecties. Proefschrift, Utrecht.
- Bänffer, J.R.J. (1962). Br. Med. J., 2, 1224.
- Bänffer, J.R.J. en J.F. Franken (1967). Path. Microbiol., 30, 166.
- Barber, M. en S.W.A. Kuper (1951). J. Path. Bact., 63, 65.
- Barber, M. en P. Wildy (1958). J. Gen. Microbiol., 18, 92.
- Bautz, E. en E. Freese (1960). Proc. Natl. Ac. Sci. Wash., 46, 1585.
- Bergdoll, M.S. (1970). Enterotoxins. Microbial toxins, volume III. Academic Press, New York and London.
- Bernheimer, A.W. (1968). Science, 159, 847.
- Bertani, G. (1958). Adv. in Virus Res., 5, 151.
- Blair, J.E. en R.E.O. Williams (1961). Bull. W.H.O., 24, 771.
- Boake, W.C. (1956). J. Immunol., 76, 89.
- Brookes, P. en P.D. Lawley (1960). Biochem. J., 77, 478.
- Burnet, F.M. (1937). Austr. Jr. Exp. Biol. Med. Sci., 15, 227.
- Cluff, L.E. (1965). Ann. N.Y. Acad. Sci., 128, 214.
- Cluff, L.E., R.C. Reynolds, D.L. Page en J.L. Beckenridge (1968). Ann. Intern. Med., 69, 859.
- Egan, J.B. en M.L. Morse (1965). Biochim. Biophys. Acta, 109, 172.
- Elek, S.D. en E. Levy (1950). J. Path. Bact., 62, 541.
- Elek, S.D. en P.E. Conen (1957). Brit. J. Exp. Path., 38, 573.
- Elek, S.D. (1959). Staphylococcus pyogenes and its relation to disease. Livingstone, Edingburgh and London, England.
- Fisher, S. en J.E. Robson (1963). J. Inf. Dis., 113, 204.
- Fisher, S. (1963). J. Inf. Dis., 113, 213.
- Fisher, S. (1965). J. Inf. Dis., 115, 285.
- Freeman, V.J. (1951). J. Bact., 61, 675.
- Gladstone, G.P. en E.J.G. Glencross (1960). Brit. J. Exp. Path., 41, 313.
- Gladstone, G.P. en W.E. van Heyningen (1957). Brit. J. Exp. Path., 38, 123.

- Gorrill, R.H. (1958). Br. J. Exp. Path., 39, 203.
- Gorrill, R.H. en E.M. McNeil (1963). Br. J. Exp. Path., 44, 404.
- Guyonnet, F. en M. Plommet (1970). Ann. Inst. Pasteur, 118, 19.
- Hayes, W. (1968). The genetics of bacteria and their viruses.  
2nd ed., Blackwell Sci. Publ., Oxford and Edingburgh.
- Hill, M.J. (1968). J. Med. Microbiol., 1, 33.
- Hill, M.J. (1969). J. Med. Microbiol., 2, 1.
- Himmelweit, F. (1944). J. Path. Bact., 56, 271.
- Jacobs, S.I., A.T. Willis en G.M. Goodburn (1964). J. Path. Bact., 87, 151.
- Jessen, O., K. Rosendal, P. Bülow, V. Faber, K.R. Eriksen (1969). Nw. Engl. J. Med., 281, 627.
- Kapral, F.A. en J.W. Li (1960). Proc. Soc. Exp. Biol., 104, 151.
- Kapral, F.A. (1965). Ann. N.Y. Acad. Sci., 128, 259.
- Karas, E.M. en F.A. Kapral (1962). J. Inf. Dis., 111, 209.
- Keene, W.R., B.H. Minchew en L.E. Cluff (1961). Nw. Engl. J. Med., 265, 1128.
- Kleck, J.L. en J.A. Donahue (1968). J. Inf. Dis., 118, 317.
- Klemperer, R. en G. Haughton (1957). J. Clin. Path., 10, 96.
- Korman, R.Z. (1963). J. Bact., 86, 363.
- Lack, C.H. en D.G. Wailing (1954). J. Path. Bact., 68, 431.
- Li, I.W. en F.A. Kapral (1962). J. Inf. Dis., 111, 204.
- Lominski, I., D.D. Smith, A.C. Scott, J.P. Arbuthnott, S. Gray, D. Muir, G.H. Turner en C.K. Hedges (1962). Lancet I, 1315.
- Loveless, A. en S. Howarth (1959). Nature (London), 184, 1780.
- Marks, J. en A.C.T. Vaughan (1950). J. Path. Bact., 62, 597.
- McClatchy, J.K. en E.D. Rosenblum (1966a). J. Bact., 92, 575.
- McClatchy, J.K. en E.D. Rosenblum (1966b). J. Bact., 92, 580.
- Meynell, G.G. en E. Meynell (1965). Theory and practice in experimental bacteriology, Cambridge Un. Press.
- Michel, M.F. (1961). De invloed van aminozuren op het ontstaan van L-vormen van groep A streptococcen. Proefschrift, Leiden.
- Miles, A.A. en S.S. Misra (1938). J. Hyg., Camb., 38, 732.
- Miles, A.A., E.M. Miles en J. Burke (1957). Br. J. Exp. Path., 38, 79.
- Minchew, B.H. en L.E. Cluff (1961). J. Chron. Dis., 13, 354.
- Mudd, S., G.P. Gladstone en N.A. Lenhart (1965). Br. J. Exp. Path., 46, 455.
- Noble, W.C. (1965). Br. J. Exp. Path., 46, 254.
- Noble, W.C. (1966). J. Path. Bact., 91, 181.
- Nowotny, A. (1969). Basic exercises in immunochemistry. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, New York.
- Otsuji, N., M. Sekiguchi, T. Iijima en Y. Takagi (1959). Nature (London), 184, 1079.
- Rogers, D.E. (1956). Ann. N.Y. Acad. Sci., 65, 73.
- Rosendal, K. en P. Bülow (1965). J. Gen. Microbiol., 41, 439.
- Rountree, P.M. (1949). J. Gen. Microbiol., 3, 164.
- Selbie, F.R. en R.D. Simon (1952). Br. J. Exp. Path., 33, 315.
- Sierra, G. (1957). Antonie van Leeuwenhoek, 23, 15.
- Skegg, J.L. en S.G. Anderson (1969). Bull. W.H.O., 40, 593.
- Smith, H. (1968). Bact. Rev., Am. Soc. Microbiol., 32, 164.

- Smith, M.L. en S.A. Price (1938). J. Path. Bact., 47, 379.
- Soulier, J.P. en O. Prou-Wartelle (1967). Thrombos. Diathes. Hemorrh. (Stuttgart), 7, 321.
- Stewart, G.T. (1965). Ann. N.Y. Acad. Sci., 128, 132.
- Tager, M. (1956). J. Exp. Med., 104, 675.
- Tager, M. en M.C. Drummond (1965). Ann. N.Y. Acad. Sci., 128, 92.
- Taubler, J.H., F.A. Kapral en S. Mudd (1963). J. Bact., 86, 51.
- Verhoef, J. (1970). Fagotypering van coagulase-negatieve stafylococcen. Proefschrift, Utrecht.
- Vijver, J.C.M. van der, M. van Es-Boon en M.F. Michel (1972). J. Virol., in press.
- Waart, J. de (1964). Lysogene conversie bij stafylococcen. Proefschrift, Utrecht.
- Weissbach, A. en A. Lisio (1965). Biochemistry, 4, 196.
- Williams, R.E.O. (1967). Path. Microbiol., 30, 932.
- Winkler, K.C., J. de Waart, C. Grooten (1965). J. Gen. Microbiol., 39, 321.
- Wiseman, G.M. (1970). The beta and delta-toxins of Staphylococcus aureus. Microbial toxins, volume III. Academic Press, New York and London.
- Wolin, M.J., A.R. Archibald en J. Baddiley (1966). Nature (London), 209, 484.
- Woodin, A.M. (1970). Staphylococcal leucocidin. Microbial toxins. volume III, Academic Press, New York and London.
- Worms, R. (1966). Postepy Mikrobiol., 5, 473.
- Zabriski, J.B. (1964). The streptococcus rheumatic fever and glomerulonephritis. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.





## CURRICULUM VITAE

De schrijver van dit proefschrift werd geboren te Schiedam op 6 januari 1937. In 1955 werd aan het R.K. Gymnasium "Katwijk", De Breul, te Zeist het eindexamen gymnasium B behaald. Het artsexamen werd in 1964 afgelegd aan de Rijksuniversiteit te Leiden. De opleiding tot specialist in de inwendige geneeskunde werd in 1965 aangevangen op de afdeling Inwendige Ziekten (Hoofd J.H. Pannekoek) van het St. Geertruiden Gasthuis te Deventer.

Na een stage in de Kliniek voor Longziekten (Hoofd Prof. Dr. H. Deenstra) van de Stichting Academisch Ziekenhuis te Utrecht werd de opleiding voortgezet op de afdeling Inwendige Geneeskunde III (Hoofd Prof. Dr. A. Querido) van het Academisch Ziekenhuis - Dijkzigt Rotterdam. Inschrijving als specialist in de inwendige geneeskunde in het specialistenregister vond plaats in 1970. Het in dit proefschrift beschreven onderzoek werd in 1969 begonnen op de afdeling Klinische Microbiologie en Antimicrobiële Therapie van de Medische Faculteit te Rotterdam (Hoofd Prof. Dr. M.F. Michel). Thans is de schrijver verbonden aan de afdeling Inwendige Geneeskunde III (Hoofd Prof. Dr. J.C. Birkenhäger) van het Academisch Ziekenhuis - Dijkzigt Rotterdam.

## A solid medium for visual demonstration of coagulase production by *Staphylococcus aureus*

J. C. M. VAN DER VIJVER, C. A. KRAAYEVELD,  
AND M. F. MICHEL



## Technical methods

### A solid medium for visual demonstration of coagulase production by *Staphylococcus aureus*

J. C. M. VAN DER VIJVER, C. A. KRAAYEVELD, AND M. F. MICHEL *From the Department of Clinical Microbiology and Antimicrobial Therapy, Medical Faculty, Rotterdam, Netherlands*

The tube test for free coagulase is the most reliable method for the distinction between *Staph. aureus* and *Staph. albus* in the clinical laboratory, since the whole plasma-containing solid media (Penfold, 1944; Lack, 1957; Esber and Faulconer, 1959) show false-positive reactions with coagulase-negative staphylococci (Williams and Harper, 1946; Klemperer and Haughton, 1957; Lotter and Horstman, 1967). These non-specific reactions appear practically eliminated in the medium of Klemperer and Haughton (1957) because of its low plasma content (3%). In practice this medium has the inconvenience that any new batch of plates must be prepared with fresh active plasma. As the clotting activity of coagulase is based on its reaction with a coagulase-reacting factor in plasma, which is identical with prothrombin (Tager, 1956; Soulier and Prou, Wartelle, 1967), a prothrombin preparation could also be used. The object of the present paper is to describe a solid medium for the detection of coagulase production using a stable human prothrombin preparation.

#### Material and Methods

The tube coagulase test was performed with Difco plasma according to the prescriptions of the manufacturer, the slide test according to Cadness-Graves, Williams, Harper, and Miles (1943). Staphylococcal strains were identified according to the criteria of Baird-Parker (1963), the Enterobacteriaceae and group A haemolytic streptococci according to the methods described by Bailey and Scott (1970).

#### Methods of Prothrombin Preparation

Five hundred ml frozen plasma ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) was the starting material. The plasma pooled from two

donors was obtained from the blood bank. For adsorption of the prothrombin a suspension of 20% (w/v) aluminiumhydroxide (Moist gel, BDH) and 20% (w/v) ethanolyzed cellulose (Grycksbo, Papersbrück, Sweden) was prepared (Bruning, 1970). The eluting fluid consisted of a 0.25 M disodium hydrogen phosphate solution supplemented with 1% (v/v) of a 0.3 M disodium-EDTA (Analar, BDH) solution preventing spontaneous thrombin formation by calcium ions. After thawing for 30 minutes at  $37^{\circ}\text{C}$ , the prothrombin was adsorbed by adding 25 ml aluminiumhydroxide suspension to 500 ml plasma in a plastic centrifuge tube and manual mixing for five minutes at room temperature. Prolonged adsorption must be avoided because of loss of prothrombin activity (Bruning, 1970). After centrifugation at 700 g for 20 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$ , the supernatant fluid containing the  $\gamma$ -globulins was decanted. Elution of prothrombin occurred by adding 50 ml phosphate-EDTA solution to the precipitate. After magnetic stirring for 20 minutes at room temperature, a second centrifugation was performed at 16000 g for 20 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant fluid, about 50 ml, was decanted. The pH was then adjusted to 7.5 by slowly adding 1 volume 0.5 M sodium-dihydrogen phosphate solution with a pH of 4.2 to 20 volumes of the eluate under constant manual mixing. The eluate was sterilized by successive filtration through a 1.2 and 0.45  $\mu\text{m}$  Millipore membrane filter. Finally the eluate was checked for prothrombin activity according to the method described by Loeliger and Koller (1952) and lyophilized and stored at  $4^{\circ}\text{C}$  in ampoules of 1 ml.

#### Preparation of the Coagulase Medium

A 3% bovine fibrinogen solution was prepared as follows: 1800 mg bovine fibrinogen (Poviet, Amsterdam, containing 66.1% clottable protein) was added to 60 ml saline and solubilized by magnetic stirring for one to two hours. After filtering through a Whatman no. 1 filter, the solution was sterilized through a Seitz filter (EKS no. 6). The lyophilized prothrombin preparation was reconstituted in 1 ml saline and subsequently diluted to 30 ml in saline. For preparing the standard medium 50 ml freshly prepared fibrinogen solution and 30 ml diluted prothrombin preparation were added to 1 litre

	Number Tested	Number of Positive Reactions			
		Difco Tube Coagulase Test	Plate Coagulase Test	Slide Coagulase Test with Difco Plasma	Slide Coagulase Test with Human Plasma
<i>Staph. aureus</i> from nasal carriers	100	100	100	89 <sup>1</sup>	93 <sup>1</sup>
<i>Staph. aureus</i> from clinical material	200	200	200	—	—
<i>Staph. albus</i> from clinical material	100	0	0	0 <sup>2</sup>	1 <sup>2</sup>

Table The results of the plate test for coagulase production as compared with the tube and slide test in *Staph. aureus* and *Staph. albus*.

<sup>1</sup>One autoagglutination excluded. <sup>2</sup>Five autoagglutinations excluded.

autoclaved molten brain heart infusion agar (Difco) at 45°C, mixed, and poured immediately. (A temperature above 45°C transforms the fibrinogen in fibrin resulting in difficulties in reading of the plate due to the action of staphylokinase.)

## Results

The prothrombin activity of six different prothrombin preparations varied from 300 to 350% as compared with our standard of normal human plasma. To determine the optimal prothrombin content in the medium, different plates with undiluted and 1/5, 1/10, 1/30, 1/60, 1/90, and 1/150 diluted prothrombin preparation were spot inoculated (5 mm or less) with eight strong and seven weak coagulase-producing strains. The narrow zones of opacity of the weak reactions became negative or difficult to read with the prothrombin dilution 1/90. The optimum incubation time of the plates is 18 hours at 37°C. After 18 hours of incubation fibrinolysis or proteolysis can give disturbing effects. In view of the above result a medium containing a prothrombin preparation in a dilution of 1/30 was adopted as the standard.

On this medium 300 strains of *Staph. aureus* and 100 strains of *Staph. albus* were tested and the results were compared with the tube and slide coagulase test. It can be seen in the Table that complete agreement exists between the results obtained with the coagulase plate test and the tube test. *Staph. albus* gave no false positive reactions. The slide test with Difco plasma was in 10% false negative, with fresh human plasma in 4%. No false positive reactions were obtained with five strains of the common genera of Enterobacteriaceae and haemolytic streptococci.

When retested after one year, the prothrombin activity of the lyophilized prothrombin preparation used in the experiments described above remained unchanged. This was also the case when this preparation was used in the solid medium and tested with the series of seven weak coagulase-producing staphylococcal strains, indicated before. If kept at 4°C, the quality of the plates remained unchanged for one month.

## Comment

From the results it appears that a coagulase plate with bovine fibrinogen and prothrombin as a source of CRF is well suited for routine bacteriology and constitutes a convenient method for the identification of *Staph. aureus*.

From a practical point of view the preparation of the medium is simple. From 500 ml plasma 50 ml prothrombin preparation can be made, lyophilized and stored in 1 ml ampoules. After reconstitution and 1/30 dilution of the content of such an ampoule 1 l medium or 70 plates can be poured. The yield of one plasma fractionation is sufficient for the preparation of 3 000 plates.

It appears that the use of prothrombin instead of whole plasma has solved the problem of inactivity of some plasmas as the preparation is devoid of the  $\gamma$ -globulins excluding activity of anticoagulase (Lominski and Roberts, 1946; Tager and Hales, 1948).

## References

- Bailey, W. R., and Scott, E. G. (1970). *Diagnostic Microbiology*, 3rd ed. Mosby, St Louis.
- Baird-Parker, A. C. (1963). A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests. *J. gen. Microbiol.*, 30, 409-427.
- Bruning, P. F. (1970). Prothrombal a new concentrate of human prothrombin complex for clinical use. M.D. Thesis, State University Leyden, edited by Beugelsdijk, Leyden, Netherlands.
- Cadness-Graves, B., Williams, R., Harper, G. J., and Miles, A. A. (1943). Slide-test for coagulase-positive staphylococci. *Lancet*, 1, 736-738.
- Esber, R. J., and Faulconer, R. J. (1959). A medium for initial visual demonstration of production of coagulase and fermentation of mannitol by pathogenic staphylococci. *Amer. J. clin. Path.*, 32, 192-194.
- Klemperer, R., and Haughton, G. (1957). A medium for the rapid recognition of penicilline-resistant coagulase-positive staphylococci. *J. clin. Path.*, 10, 96-99.
- Lack, C. H. (1957). Plate coagulase and fibrinolysis tests for staphylococci. *J. clin. Path.*, 10 (3), 208-210.
- Loeliger, E. A., and Koller, F. (1952). Behaviour of factor VII and prothrombin during late pregnancy and in the newborn. *Acta haemat. (Basel)*, 7, 157-161.
- Lominski, I., and Roberts, G. B. S. (1946). A substance in human serum inhibiting staphylocoagulase. *J. Path. Bact.*, 58, 187-197.
- Lotter, L. P., and Horstman, B. S. M. (1967). Comparison of a tube method and a plate method for detecting coagulase production. *Amer. J. clin. Path.*, 48, 153-155.
- Penfold, J. B. (1944). Coagulase production by staphylococci on a solid medium. *J. Path. Bact.*, 56, 247-250.

- Soulier, J. P., and Prou-Wartelle, O., (1967). Study of thrombin coagulase. *Thrombos. Diathes. haemorrh. (Stuttg.)*, 17, 321-334.
- Tager, M. (1956). Studies on the nature and the purification of the coagulase reacting factor and its relation to prothrombin. *J. exp. Med.*, 104, 675-686.
- Tager, M., and Hales, H. B. (1948). The experimental production of antibodies to staphylocoagulase. *J. Immunol.*, 60, 475-485.
- Williams, R. E. O., and Harper, G. J. (1946). Determination of coagulase and alpha-haemolysins production by staphylococci. *Brit. J. exp. Path.*, 27, 72-81.
-







